

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

SILENÇAGE GÉNIQUE DE L'ARNM CODANT POUR
L'APOLIPOPROTÉINE B APRÈS ADMINISTRATION PAR VOIE
INTRA VEINEUSE DE NANOPARTICULES CHITOSANE/SIARN-APOB
DANS UN MODÈLE MURIN D'ATHÉROSCLÉROSE

DIOGO LOPES DE JESUS

INSTITUT DE GÉNIE BIOMÉDICAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES
(GÉNIE BIOMÉDICAL)

DÉCEMBRE 2011

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire est intitulé:

SILENÇAGE GÉNÉRIQUE DE L'ARNM CODANT POUR L'APOLIPOPROTÉINE B APRÈS
ADMINISTRATION PAR VOIE INTRAVEINEUSE DE NANOPARTICULES
CHITOSANE/SIARN-APOB DANS UN MODÈLE MURIN D'ATHÉROSCLÉROSE

présenté par : DE JESUS Diogo Lopes

en vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès sciences appliquées

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

M. DE CRESCENZO Gregory, Ph.D., président

M. MERZOUKI Abderrazzak, Ph.D., membre et directeur de recherche

M. BUSCHMANN Michael, Ph.D., membre et codirecteur de recherche

M. LAVERTU Marc, Ph.D., membre

DÉDICACE

*Ce mémoire est dédié à
ma grand-mère Victória Gomes Basílio &
mon oncle Manuel Albuquerque Da Silva.*

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche Abderrazzak Merzouki et mon co-directeur Michael D. Buschmann de m'avoir accueilli dans leur équipe de recherche et permis de mener à bien mon projet. Leur soutien, leur enseignement et leurs critiques constructives ont été un guide exceptionnel dans mon cheminement académique.

Je voudrais également remercier toute l'équipe du Dr. Buschmann pour leur support intellectuel et moral, particulièrement Chi-Yuan Chang, Viorica Lascau, Monica Nelea Iliescu et Julie Tremblay. De plus, j'aimerais remercier mes amis et collègues Myriam Jean, Mohamad-Gabriel Alameh, Mohamed Benhammadi et Rabeb Mouna Derbali pour leur aide indispensable et leurs conseils judicieux d'ordre scientifique et personnel. Évidemment, je tiens à offrir mes remerciements sincères à tous les individus ayant contribué à ce projet de maîtrise.

Mon projet de maîtrise ès sciences appliquées a été rendu possible grâce aux bourses d'excellence offertes par l'École Polytechnique de Montréal, au support financier des laboratoires du Dr. Merzouki et Dr. Buschmann et aux subventions octroyées aux Drs. Buschmann et Merzouki par les Instituts de recherche en santé du Canada (IRSC).

Je tiens à souligner tout le support et le réconfort que mes amis m'ont donné au courant de mes études. Enfin, je voudrais offrir toute ma gratitude à ma famille pour leur support inébranlable, leur patience et leur amour. Ils sont la raison pour laquelle j'ai réussi à mener mes études à terme et ils seront toujours à l'origine de mes accomplissements.

RÉSUMÉ

L'athérosclérose est une maladie inflammatoire auto-suffisante dont le développement progressif asymptomatique mène à la majorité des maladies cardiovasculaires causant approximativement 75 000 décès par année au Canada seulement. L'apolipoprotéine B (ApoB) est une composante structurale essentielle des lipoprotéines de faible densité (LDL), responsables de l'initiation et du développement de l'athérosclérose. Les médicaments actuels ne font que ralentir le développement athérosclérotique au lieu d'atteindre la source du problème qui est principalement l'ApoB. D'où l'importance de trouver une nouvelle avenue biomédicale telle que le silençage génique de l'ApoB en utilisant un système conçu pour livrer systématiquement des petits ARN interférents (siARN) et pour les libérer dans des cellules « cibles ». Nous avons donc pour hypothèse de recherche que l'administration par voie intraveineuse des nanoparticules chitosane/siARN-ApoB est en mesure d'induire des effets thérapeutiques sécuritaires dans un modèle murin d'athérosclérose.

Le chitosane est un polymère cationique, naturel et biodégradable dont les caractéristiques intrinsèques varient en fonction de son degré de désacétylation (DD) et sa masse moléculaire (MM). De plus, le ratio amine de chitosane : phosphate de siARN (N:P) utilisé pour former les nanoparticules, ainsi que le DD et la MM du chitosane influencent grandement les caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules. Les formulations de chitosane (DD-MM-N:P) utilisées dans le cadre de ce projet, soit le 92-10-5, le 80-80-5 et le 80-10-10 ont été préalablement évaluées en thérapie génique.

Les analyses par microscopie électronique à balayage environnemental (ESEM) et par diffusion dynamique de la lumière (DLS) ont démontré que les nanoparticules chitosane/oligonucléotides double brin (ODNdb)-ApoB sphériques et homogènes possèdent des tailles et des potentiels zêta (ζ) variant entre 41 et 108 nm et entre 15 et 23 mV, respectivement. L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide a démontré la stabilité des nanoparticules chitosane/ODNdb-ApoB formées de chitosane 92-10 à divers ratios N:P lors d'incubation à différentes périodes dans des solutions de pH différents. Nous avons également démontré par électrophorèse sur gel d'agarose que le chitosane est en mesure de protéger efficacement les ODNdb-ApoB contre la dégradation à des concentrations supra-physiologiques de désoxyribonucléases I (ADNase I) (2 unités d'ADNase I/ μ g d'ODNdb).

Nous avons déterminé par cytométrie en flux que les nanoparticules chitosane (92-10-5)/ODNdb-ApoB atteignent des niveaux de transfection de 55, 88 et 66 % dans les cellules HepG2, HEK293 et RAW264.7, respectivement. Dans les mêmes lignées cellulaires, l'imagerie par microscopie confocale a permis de mettre en évidence des nanoparticules internalisées, ainsi que des ODNdb-ApoB libérés, révélant une délivrance endolysosomale des nanoparticules.

La quantification relative du niveau d'expression de l'ARNm codant pour l'ApoB par amplification quantitative en chaîne par polymérase en temps réel (qRT-PCR) indique que la transfection des cellules HepG2 par des nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB entraîne un niveau de silençage génique de l'ApoB de l'ordre de 50 %.

Nous avons évalué les effets phénotypiques *in vivo* des siARN-ApoB administrés dans un modèle murin d'athérosclérose (souris C57BL/6). Les nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB ont été administrées par voie intraveineuse (1 mg/kg) à différentes périodes du développement athérosclérotique. En utilisant un ELISA en sandwich, nous avons déterminé que l'administration de nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB réduit d'approximativement 30 % le niveau d'ApoB en circulation chez les souris athérosclérotiques durant six semaines, malgré la continuation d'une diète riche en gras. Les souris athérosclérotiques traitées atteignent un niveau d'ApoB en circulation comparable à celui des souris non-athérosclérotiques. En utilisant un test quantitatif de détection colorimétrique, nous avons mesuré une réduction du niveau de cholestérol associé aux lipoprotéines de faible densité et de très faible densité (LDL et VLDL) d'approximativement 20 % s'étalant sur six semaines chez les souris athérosclérotiques traitées, reflétant la réduction d'ApoB en circulation. Notre analyse d'hépatotoxicité suggère que les nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB n'affecte pas les fonctions hépatiques spécifiques aux souris athérosclérotiques. Les analyses histologiques des coupes de foie colorées à l'hématoxyline-éosine suggèrent quant à elles que l'administration de nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB entraîne la réduction de la stéatose des souris athérosclérotiques quatre semaines après la fin du traitement. De plus, les analyses histologiques sur des coupes de foie colorées au safranin-O/Fast-green/hématoxyline de fer tendent à indiquer que l'infiltration lymphoïde hépatique, principalement due à la stéatose, s'est résorbée trois semaines après la fin du traitement.

En conclusion, nous avons été en mesure d'induire des effets thérapeutiques sécuritaires dans un modèle animal d'athérosclérose suite à l'administration de nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB par voie intraveineuse. La caractérisation physico-chimique des nanoparticules, l'étude *in vitro* ainsi que l'étude *in vivo* ont démontré le potentiel thérapeutique des nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB dans le traitement de l'athérosclérose. Notre projet est une preuve de concept réussie qui sera prochainement poursuivi par étude *in vivo* à grande échelle ayant pour but d'évaluer les effets thérapeutiques des nanoparticules chitosane/siARN-ApoB sur un modèle animal d'athérosclérose.

ABSTRACT

Atherosclerosis is a self-sufficient inflammatory disease whose asymptomatic progressive development leads to the majority of cardiovascular diseases causing approximately 75 000 death per year in Canada only. Apolipoprotein B (ApoB) is an essential structural component of low density lipoproteins (LDL), which are responsible for the initiation and the development of atherosclerosis. Actual medication can only slow the atherosclerotic development instead of targeting the source of the problem which is the ApoB. Hence the importance of finding a new biomedical technique such as the ApoB gene silencing using a system designed to release small interfering RNAs (siRNA) in targeted cells. We therefore hypothesized that intravenous administration of chitosan/siRNA-ApoB nanoparticles would be able to induce safe therapeutic effects in a murine model of atherosclerosis.

Chitosan is a cationic, natural and biodegradable polymer whose intrinsic characteristics vary according to its degree of deacetylation (DDA), molecular weight (MW) and the chitosan's amine : siRNA's phosphate ratio (N:P) used to form nanoparticles. Chitosan formulations (DDA-MW-N:P) used in this research project, either 92-10-5, 80-80-5 and 80-10-10, were previously studied in gene therapy.

Analysis using Environmental Scanning Electron Microscopy and Dynamic Light Scattering (DLS) showed that spherical and homogenous chitosan/double stranded oligonucleotides (dsODN)-ApoB nanoparticles had sizes and zeta (ζ)-potentials ranging respectively from 41 to 108 nm and 15 to 23 mV. Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) demonstrated the high stability of chitosan/dsODN-ApoB nanoparticles formed with chitosan 92-10 at various N:P ratios when incubated in solution of various pHs for various amounts of time. We also demonstrated using agarose gel electrophoresis that chitosan efficiently protected dsODN-ApoB from digestion by supraphysiological concentrations of desoxyribonuclease I (DNase I) (2 units of DNase I/ μ g of dsODN).

We determined using flow cytometry that chitosan (92-10-5)/dsODN-ApoB nanoparticles attained transfection levels of 55, 86 and 66 % in HepG2, HEK293 and RAW264.7 cells respectively. In the same cell lines, confocal microscopy imaging showed internalized nanoparticles, as well as released dsODN-ApoB indicative of endolysosomal release.

The relative quantification of the expression level of mRNAs coding for ApoB using qRT-PCR showed that transfecting HepG2 cells with chitosan (92-10-5)/siRNA-ApoB nanoparticles resulted in an ApoB gene silencing level of about 50 %.

We evaluated the *in vivo* therapeutic effects of siRNA-ApoB administered in a murine model of atherosclerosis (C57BL/6 mice). Chitosan (92-10-5)/siRNA-ApoB nanoparticles were administrated intravenously (1 mg/kg) at various moments of atherosclerotic development. Using a sandwich ELISA, we determined that administration of chitosan (92-10-5)/siRNA-ApoB nanoparticles caused a reduction of circulating ApoB level of about 30 % in atherosclerotic mice over a period of six weeks, despite the continuation of a high-fat diet. Treated atherosclerotic mice reached a level of circulating ApoB comparable to that of non-atherosclerotic mice. Using a quantitative colorimetric detection test, we measured a reduction of circulating LDL/VLDL cholesterol level of about 20 % in treated atherosclerotic mice over a period of six weeks, reflecting the reduction of circulating ApoB. Our hepatotoxicity analysis suggested that chitosan (92-10-5)/siRNA-ApoB nanoparticles did not affect the hepatic functions related to atherosclerotic mice. Our histological analysis of liver sections stained with hematoxylin-eosin suggested that administration of chitosan (92-10-5)/siRNA-ApoB nanoparticles healed the steatosis of atherosclerotic mice four weeks after the end of treatment. Moreover, our histological analysis of liver sections stained with safranin-O/Fast-green/iron hematoxylin implied that hepatic lymphocytic infiltrations resulting mainly from steatosis were reduced three weeks after the end of treatment.

In conclusion, we were able to induce, for the first time, safe therapeutic effects in an animal model of atherosclerosis following intravenous administration of chitosan (92-10-5)/siRNA-ApoB nanoparticles. The physicochemical characterization of the nanoparticles, the *in vitro* study as well as the *in vivo* study showed the therapeutic potential of chitosan (92-10-5)/siRNA-ApoB nanoparticles for the treatment of atherosclerosis. Our project is a successful proof of concept that will soon be developed into a large scale *in vivo* study designed to evaluate the therapeutic effects of chitosan/siRNA-ApoB nanoparticles on an atherosclerotic animal model.

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE.....	III
REMERCIEMENTS	IV
RÉSUMÉ.....	V
ABSTRACT	VIII
TABLE DES MATIÈRES	X
LISTE DES TABLEAUX.....	XV
LISTE DES FIGURES	XVI
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XIX
LISTE DES ANNEXES	XXII
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1 REVUE DE LITTÉRATURE	4
1.1 L'athérosclérose	4
1.1.1 Les aspects socio-économiques.....	4
1.1.2 Les facteurs de risque	5
1.1.3 L'athérogénèse causée par l'accumulation de LDL	5
1.1.4 Les conséquences de la modification des LDL	6
1.1.5 Le recrutement des monocytes	6
1.1.6 La transformation des macrophages.....	7
1.1.7 L'autosuffisance de l'athérosclérose	7
1.1.8 L'immunité acquise cellulaire impliquée dans l'athérogénèse	8
1.1.9 L'aspect antiathérogène de l'immunité acquise humorale	8
1.1.10 Le point culminant du développement athérosclérotique	9
1.2 Les lipoprotéines et les apolipoprotéines	9

1.2.1	La nature des lipoprotéines	9
1.2.2	Les familles de lipoprotéines athérogènes	10
1.2.3	La corrélation entre les lipoprotéines athérogènes et les ApoB	11
1.2.4	Le rôle de l'ApoB et la formation des lipoprotéines	11
1.2.5	La régulation des formes de l'ApoB	11
1.2.6	Les facteurs endogènes antiathérogènes	12
1.3	Les principes et défis de l'ARNi	14
1.3.1	Historique de l'ARNi	14
1.3.2	Les enjeux de la thérapie génique par ARNi.....	15
1.3.3	Les mécanismes de l'ARNi.....	15
1.3.4	Les facteurs influençant l'efficacité du silençage génique.....	22
1.4	Les systèmes de livraison des siARN	26
1.4.1	Les nanoparticules lipidiques	26
1.4.2	Les nanoparticules polymériques	27
1.4.3	Le silençage génique de l'ApoB par l'utilisation de l'ARNi	29
1.5	Le chitosane.....	34
1.5.1	La provenance et la synthèse du chitosane.....	34
1.5.2	Les propriétés physico-chimiques du chitosane.....	36
1.5.3	L'influence du degré de désacétylation.....	36
1.5.4	L'équilibre entre le degré de désacétylation et la masse moléculaire	37
1.5.5	L'influence de la masse moléculaire et du ratio N:P	38
1.5.6	Les facteurs affectant l'efficacité de livraison et de transfection des nanoparticules chitosane/siARN	39
CHAPITRE 2	HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS	42

2.1	Hypothèse de recherche	42
2.2	Objectifs	42
2.3	Organisation du projet de recherche.....	43
CHAPITRE 3 MÉTHODOLOGIE.....		45
3.1	Préparation des nanoparticules chitosane/acides nucléiques	45
3.1.1	Synthèse des ODNdb-ApoB et des siARN-ApoB	45
3.1.2	Préparation des formulations de chitosane.....	46
3.1.3	Formation des nanoparticules chitosane/acides nucléiques	48
3.2	Caractérisation physico-chimique des nanoparticules chitosane/ODNdb-ApoB.....	48
3.2.1	Détermination de la taille et du potentiel ζ des nanoparticules chitosane/ODNdb-ApoB... ..	48
3.2.2	Analyse des nanoparticules chitosane/ODNdb-ApoB par microscopie électronique à balayage environnemental	49
3.2.3	Analyse de la formation et de la stabilité des nanoparticules chitosane/ODNdb-ApoB... ..	50
3.2.4	Étude de la protection, par le chitosane, des ODNdb-ApoB dans les nanoparticules contre la digestion par les nucléases.	51
3.3	Étude <i>in vitro</i>	52
3.3.1	Lignées cellulaires : conditions de culture et procédure de transfection.....	52
3.3.2	Étude de l'internalisation des nanoparticules chitosane/ODNdb-ApoB par cytométrie en flux et microscopie confocale	54
3.3.3	Quantification relative du niveau d'expression de l'ARNm codant pour l'ApoB par qRT-PCR.....	56
3.4	Étude <i>in vivo</i> chez les souris C57BL/6.....	59

3.4.1	Manipulation des souris C57BL/6.....	59
3.4.2	Analyse d'hépatotoxicité.....	65
3.4.3	Détermination de la réduction d'ApoB en circulation	66
3.4.4	Détermination de la réduction de cholestérol LDL/VLDL en circulation	66
3.4.5	Les analyses histologiques	67
3.5	Analyse statistique.....	69
CHAPITRE 4 RÉSULTATS		71
4.1	Caractérisation physico-chimique des nanoparticules chitosane/ODNdb-ApoB.....	71
4.1.1	Détermination de la taille et du potentiel ζ des nanoparticules chitosane/ODNdb-ApoB... ..	71
4.1.2	Analyse des nanoparticules chitosane/ODNdb-ApoB par microscopie électronique à balayage environnemental	72
4.1.3	Analyse de la formation et de la stabilité des nanoparticules chitosane/ODNdb-ApoB... ..	74
4.1.4	Étude de la protection, par le chitosane, des ODNdb-ApoB dans les nanoparticules contre la digestion par les nucléases.	78
4.2	Étude <i>in vitro</i>	79
4.2.1	Étude de l'internalisation des nanoparticules chitosane/ODNdb-ApoB par cytométrie en flux et microscopie confocale	79
4.2.2	Quantification relative du niveau d'expression de l'ARNm codant pour l'ApoB par qRT-PCR	84
4.3	Étude <i>in vivo</i> chez les souris C57BL/6.....	86
4.3.1	Évolution du poids durant l'expérimentation.....	87
4.3.2	Détermination de la réduction d'ApoB en circulation	89

4.3.3	Détermination de la réduction de cholestérol LDL/VLDL en circulation	90
4.3.4	Analyse d'hépatotoxicité.....	92
4.3.5	Analyses histologiques	93
CHAPITRE 5 DISCUSSION		98
5.1	Caractérisation physico-chimique des nanoparticules chitosane/ODNdb-ApoB.....	98
5.2	Étude <i>in vitro</i>	100
5.3	Étude <i>in vivo</i>	102
CONCLUSION		112
BIBLIOGRAPHIE		114

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1: Paramètres expérimentaux étudiés dans les publications abordant le silençage génique de l'ApoB par injection intraveineuse de siARN-ApoB dans un modèle murin.	31
Tableau 1.2: Paramètres expérimentaux étudiés dans les publications abordant le silençage génique de l'ApoB par injection intraveineuse de siARN-ApoB dans un modèle murin. (Suite)	32
Tableau 1.3: Paramètres expérimentaux étudiés dans les publications abordant le silençage génique de l'ApoB par injection intraveineuse de siARN-ApoB dans un modèle murin. (Suite)	33
Tableau 3.1: Les différentes formulations de chitosane utilisées dans le projet de recherche, selon chaque expérience.....	47
Tableau 3.2: Conditions expérimentales et jours d'injections et de prélèvements sanguins pour tous les groupes de souris.	61
Tableau 3.3: Calendrier des injections et des sacrifices	62
Tableau 4.1: Taille (DLS et ESEM), potentiel ζ (DLS) et PDI (DLS) des nanoparticules chitosane/ODNdb-ApoB pour les formulations 92-10-5, 80-80-5 et 80-10-10.	72
Tableau 4.2: Profil biochimique des souris C5-2 (souris # 2 du groupe C5) et D α -1 (souris # 1 du groupe D α) au jour de l'euthanasie et les valeurs de référence du fournisseur Charles River (Charles River Laboratories, 2005).	93

LISTE DES FIGURES

Figure 1-1: Structure d'une lipoprotéine de faible densité (LDL).....	10
Figure 1-2 : Mécanisme de silençage génique post-transcriptionnel et molécules effectrices de l'ARNi (adapté d'Aagaard & Rossi, 2007).....	19
Figure 1-3 : Désacétylation de la chitine produisant le chitosane. Modifié de (NEUROtiker, 2008)	36
Figure 2-1: Organisation du projet de recherche.....	44
Figure 3-1 : Masses moyennes (μ g) de siARN-ApoB administrés en trois injections pour les souris des groupes C1 à C5 et D β , ainsi que pour la seule injection des souris du groupe C6.	64
Figure 4-1: Images des nanoparticules chitosane/ODNdb-ApoB sphériques prises à un grossissement de 80,000X avec l'ESEM en mode vide élevé (<i>high vaccum mode</i>), pour les formulations de chitosane 92-10-5 (A), 80-80-5 (B) et 80-10-10 (C).....	73
Figure 4-2: Migration d'ODNdb-ApoB par PAGE démontrant la stabilité des nanoparticules chitosane (92-10-5)/ODNdb-ApoB incubées à pH 6,5, 7 et 8 pendant 0,5, 4 et 20 heures.	75
Figure 4-3: Migration d'ODNdb-ApoB par PAGE démontrant la stabilité des nanoparticules chitosane (80-80-5)/ODNdb-ApoB incubées à pH 6,5, 7 et 8 pendant 0,5, 4 et 20 heures.	76
Figure 4-4: Migration d'ODNdb-ApoB par PAGE démontrant la stabilité des nanoparticules chitosane (80-10-10)/ODNdb-ApoB incubées à pH 6,5, 7 et 8 pendant 0,5, 4 et 20 heures.	77
Figure 4-5: Migration d'ODNdb-ApoB sur gel d'agarose de 5 % et quantification de l'ODNdb-ApoB migrés représentant le niveau de protection offert par les formulations de chitosane 92-10-5, 80-80-5 et 80-10-10 contre différentes concentrations d'ADNase I.	79
Figure 4-6: Évaluation par cytométrie en flux du niveau de transfection cellulaire atteint par les nanoparticules chitosane/ODNdb-ApoB dans les lignées cellulaires HepG2,	

HEK293 et RAW264.7, pour les formulations de chitosane 92-10-5, 80-80-5 et 80-10-10. (n=3, $p^* < 0,05$)	80
Figure 4-7: Détection des 5' 6-FAM-ODNdb-ApoB (vert; 1), du rhodamine-chitosane (rouge; 2), des membranes des cellules (bleu; 3), des cellules sans détection de fluorochromes (4) et de la superposition de tous les signaux (5) par microscopie confocale montrant le trafic extra et intracellulaire des nanoparticules chitosane (92-10-5)/ODNdb-ApoB (jaune) pour les cellules HepG2. (Flèche normale : ODNdb-ApoB dans le cytoplasme; flèche pointillée: ODNdb-ApoB dans les endolysosomes)	82
Figure 4-8: Détection des 5' 6-FAM-ODNdb-ApoB (vert; 1), du rhodamine-chitosane (rouge; 2), des membranes des cellules (bleu; 3), des cellules sans détection de fluorochromes (4) et de la superposition de tous les signaux (5) par microscopie confocale montrant le trafic extra et intracellulaire des nanoparticules chitosane (92-10-5)/ODNdb-ApoB (jaune) pour les cellules HEK293. (Flèche normale : ODNdb-ApoB dans le cytoplasme; flèche pointillée : ODNdb-ApoB dans les endolysosomes)	83
Figure 4-9: Détection des 5' 6-FAM-ODNdb-ApoB (vert; 1), du rhodamine-chitosane (rouge; 2), des membranes des cellules (bleu; 3), des cellules sans détection de fluorochromes (4) et de la superposition de tous les signaux (5) par microscopie confocale montrant le trafic extra et intracellulaire des nanoparticules chitosane (92-10-5)/ODNdb-ApoB (jaune) pour les RAW264.7. (Flèche normale : ODNdb-ApoB dans le cytoplasme; flèche pointillée : ODNdb-ApoB dans les endolysosomes)	84
Figure 4-10: Niveaux du silençage génique de l'ApoB mesuré par qRT-PCR dans les cellules HepG2 traitées avec les nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB. (n=3; $p^{**} < 0,01$).....	86
Figure 4-11: Prise de poids hebdomadaires des souris des groupes C1-C5 et des souris des groupes contrôles D α , D β et D μ et mise en évidence de la stabilisation du poids des souris des groupes C4, D β (21-12-2010 au 28-12-2010), C5 (28-12-2010 au 04-01-2011) après leur première injection. (n=4, à l'exception du groupe C1; n=3)	88

- Figure 4-12: Détermination du niveau d'ApoB en circulation au jour de l'euthanasie par ELISA en sandwich pour tous les groupes traités (C1-C6) et groupes contrôles ($D\alpha$, $D\beta$ et $D\mu$) relativement au groupe athérosclérotique non-traité ($D\alpha$). (n=4, à l'exception du groupe C1; n=3)90
- Figure 4-13: Détection du niveau de cholestérol LDL/VLDL en circulation au jour de l'euthanasie par test quantitatif de détection colorimétrique pour tous les groupes traités (C1-C6) et groupes contrôles ($D\alpha$, $D\beta$ et $D\mu$), relativement au groupe athérosclérotique non-traité ($D\alpha$). (n=4 à l'exception du groupe C1; n=3; $p^{**} < 0,01$)91
- Figure 4-14: Coloration de coupes histologiques des tissus hépatiques par l'hématoxyline-éosine mettant en évidence l'accumulation de vacuoles de gras dans le foie d'une souris des groupes C1 (A), C2 (B), C3 (C), C4 (D), C5 (E), C6 (F), $D\alpha$ (G), $D\beta$ (H) et $D\mu$ (I). (Flèche : exemple de vacuoles de gras)95
- Figure 4-15: Coloration de coupes histologiques des tissus hépatiques par safranin-O/Fast-green/hématoxyline de fer mettant en évidence l'intégrité structurelle du foie d'une souris des groupes C1 (A), C2 (B), C3 (C), C4 (D), C5 (E), C6 (F), $D\alpha$ (G), $D\beta$ (H) et $D\mu$ (I). (Cercle: site d'infiltration lymphoïde)97

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

Cette liste présente dans l'ordre alphabétique, les sigles et les abréviations utilisés dans le cadre de ce mémoire.

2'OMe	2'-O-méthyle
6-FAM	6-carboxyfluorescéine (<i>6-carboxyfluorescein</i>)
ADNase	Désoxyribonucléase
ADNc	ADN complémentaire
ADNp	ADN plasmidique
AGO2	Argonaute 2
ALP	Phosphatase alcaline (<i>alkaline phosphatase</i>)
ALT	Alanine aminotransférase
Apo	Apolipoprotéine
ARNase	Ribonucléase
ARNdb	ARN double brin
ARNi	Interférence par ARN (<i>RNA interference</i>)
ARNm	ARN messenger
AST	Aspartate aminotransférase
Ct	Cycle seuil (<i>cycle threshold</i>)
DD	Degré de désacétylation
DLS	Diffusion dynamique de la lumière (<i>dynamic light scattering</i>)
dNTP	Désoxyribonucléoside triphosphate
ESEM	Microscopie électronique à balayage environnemental (<i>environmental scanning electron microscopy</i>)
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

GGT	Oméga-glutamyltranspeptidase
GlcN	D-glucosamine
GlcNAc	N-acétyl-D-glucosamine
¹ H RMN	Résonance magnétique nucléaire du proton
HDL	Lipoprotéine de haute densité (<i>high density lipoprotein</i>)
iNOP	Nanoparticules interférentes
LDL	Lipoprotéine de faible densité (<i>low density lipoprotein</i>)
LDLr	Récepteur de lipoprotéines de faible densité (<i>low density lipoprotein receptor</i>)
miARN	Micro ARN
MM	Masse moléculaire
N:P	Charge chitosane/acides nucléiques (amine:phosphate)
ODNdb	Oligonucléotide double brin
oxLDL	Lipoprotéine de faible densité oxydée (<i>oxidized low density lipoprotein</i>)
PAGE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
PEG	Polyéthylène glycol
PEG-SVA	Polyéthylène glycol-succinimidyl valérate
PEI	Polyéthylèneimine
Pré-miARN	Micro ARN précurseur
Pri-miARN	Micro ARN primaire
qRT-PCR	Amplification quantitative en chaîne par polymérase en temps réel (<i>quantitative real-time polymerase chain reaction</i>)
RISC	Complexe de silençage induit par l'ARN (<i>RNA-induced silencing complex</i>)
shARN	Petit ARN épingle à cheveux (<i>small hairpin RNA</i>)

siARN	Petit ARN interférent (<i>small interfering RNA</i>)
SNALP	Particules lipides/acides nucléiques stables (<i>stable nucleic acid-lipid particles</i>)
VLDL	Lipoprotéine de très faible densité (<i>very low density lipoprotein</i>)

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE – Communications.....	127
------------------------------	-----

INTRODUCTION

L'athérosclérose est une maladie inflammatoire auto-suffisante à l'origine de la plupart des maladies cardiovasculaires (Ohsfeldt, Gandhi, Fox, Bullano, & Davidson, 2010). Les maladies cardiovasculaires correspondent à la première cause de mortalité au niveau mondial avec 75000 décès par année au Canada seulement (Canadian Institutes of Health Research, 2009). Ce nombre important de décès reflète l'énorme fardeau socio-économique que représente l'athérosclérose. L'athérogénèse est amorcée par l'accumulation d'un nombre grandissant de lipoprotéines de faible densité (LDL : *low density lipoprotein*) dans l'intima des artères stimulant la réaction immunitaire innée (Binder, et al., 2002; Paoletti, Gotto, & Hajjar, 2004). Les LDL sont subséquemment modifiées et internalisées dans des macrophages dont le nombre ne cesse d'augmenter avec l'évolution de l'athérosclérose. Le nombre grandissant de cellules, de LDL modifiées et de déchets dans l'intima mène à la formation d'un cœur nécrotique en croissance constante et au développement de la plaque athérosclérotique (Libby, Ridker, & Maseri, 2002; Lusis, 2000). La croissance du cœur nécrotique, ainsi que l'implication de la réaction immunitaire acquise cellulaire contribuent à l'amincissement et la fragilisation de la chape fibreuse séparant le cœur nécrotique de la lumière de l'artère. Par conséquent, un événement augmentant la contrainte de cisaillement sur la chape fibreuse peut conduire à sa rupture causant le déversement du cœur nécrotique dans la lumière de l'artère (Spagnoli, Bonanno, Sangiorgi, & Mauriello, 2007). La thrombose formée à la suite de la rupture est reliée aux nombreuses complications de l'athérosclérose telles que l'angine de poitrine, l'infarctus du myocarde, l'insuffisance cardiaque et les accidents vasculaires cérébraux (Lloyd-Jones, et al., 2010; Toth, 2008). Malgré la gravité de l'athérosclérose, aucun traitement pharmaceutique préventif ou thérapeutique efficace n'existe à ce jour. En effet, les traitements actuels visent à ralentir le développement athérosclérotique par le contrôle du métabolisme du cholestérol ou en régulant la synthèse de lipoprotéines de haute densité (HDL : *high density lipoprotein*) à la hausse en utilisant les statines ou les fibrates, respectivement.

La formation des LDL athérogènes dépend de l'apolipoprotéine B (ApoB) sécrétée principalement par le foie (Mahley, Innerarity, Rall, & Weisgraber, 1984). L'ApoB est essentielle à l'assemblage de la plupart des lipoprotéines de faibles densités (Olofsson & Boren, 2005) et elle interagit avec la matrice protéoglycane de l'intima artérielle de manière à retenir les LDL

(Lusis, 2000). Par conséquent, la diminution de la sécrétion de l'ApoB nuirait considérablement au développement de l'athérosclérose jusqu'à éviter la contraction d'une maladie cardiovasculaire. Le silençage génique post-transcriptionnel par des ARN interférents permet de cibler une séquence d'acides ribonucléiques messager (ARNm) spécifique codant pour l'expression d'une protéine responsable du développement d'une maladie. Ainsi, l'inhibition de l'expression de l'ARNm ApoB par l'interférence à ARN (ARNi) est une stratégie biomédicale idéale pour le traitement de l'athérosclérose. L'ARNi peut être induite par des molécules effectrices telles que des micro-ARN (miARN) endogènes, des petits ARN épingles à cheveux (shARN : *small hairpin RNA*) ou des petits ARN interférents (siARN : *small interfering RNA*) (Kim & Rossi, 2007). Toutefois, la plupart des travaux de recherche sur l'ARNi thérapeutique mettent en jeu des siARN exogènes étant donné les multiples avantages liés à la livraison et l'action des siARN (Raemdonck, Vandenbroucke, Demeester, Sanders, & De Smedt, 2008). Par contre, la livraison des siARN jusqu'aux tissus spécifiques représente un défi majeur, en raison des multiples barrières biologiques qui obstruent ou affectent le transport des siARN aux cellules ciblées, particulièrement dans le système sanguin (Juliano, Bauman, Kang, & Ming, 2009). Effectivement, la livraison systémique des siARN comporte des obstacles tels que la dégradation par les nucléases, la filtration rénale, la clairance via le système réticuloendothélial (RES : *reticuloendothelial system*), la barrière endothéliale, la matrice extracellulaire et les barrières biologiques cellulaires (Juliano, et al., 2009). Malgré cela, l'administration intraveineuse est favorisée en milieu clinique et correspond à la voie d'administration préconisée par les scientifiques traitant des maladies de source hépatique étant donné le système réticuloendothélial (RES : *reticuloendothelial system*) du foie (Shiri & Dan, 2010), sa grande vascularisation et sa susceptibilité à de nombreux agents pouvant induire des dommages hépatiques (Dyckxhoorn, Novina, & Sharp, 2003; Dyckxhoorn, Palliser, & Lieberman, 2006).

Ainsi, des systèmes de livraison ont été conçus et utilisés avec succès dans le but de contourner les barrières biologiques systémiques. L'utilisation de nanoparticules lipidiques et polymériques, cationiques ou neutres, est favorisée pour la livraison des siARN (de Fougerolles, Vornlocher, Maraganore, & Lieberman, 2007) en dépit de l'efficacité des vecteurs viraux, mais très immunogènes (Akhtar & Benter, 2007b). Le chitosane a été utilisé comme système de livraison d'acides désoxyribonucléiques plasmidiques (ADNp) (Lee, et al., 2005; Lee, et al., 2001; Li, Lee, Chan, & Alpar, 2003) et de siARN (Katas & Alpar, 2006; Liu, et al., 2007; Varkouhi, et al.,

2011) dans une multitude d'études. Le chitosane est un polymère cationique biocompatible et biodégradable dont les caractéristiques physico-chimiques ajustables, soit le degré désacétylation (DD) et sa masse moléculaire (MM), ont un impact sur les propriétés des nanoparticules formées (Mao, Sun, & Kissel, 2010). En plus du DD et de la MM, les propriétés des nanoparticules formées de chitosane sont aussi affectées par le ratio chitosane:acides nucléiques (amine:phosphate, N:P) (Rudzinski & Aminabhavi, 2010). Ainsi, le DD, la MM et le ratio N:P influencent grandement les propriétés physico-chimiques des nanoparticules, telles que leur taille, leur charge, leur capacité à rester complexées à différents pH (dans le temps) et leur efficacité de protection contre les nucléase. Les propriétés physico-chimiques affectent les événements extra et intracellulaires associés aux nanoparticules, telles que la transfection cellulaire et le silençage génique spécifique à l'ARNm ciblé (Mao, et al., 2010).

Plusieurs systèmes de livraison ont été utilisés afin de livrer des siARN-ApoB au foie par l'entremise du système sanguin, dans le but d'induire l'inhibition génique de l'ARNm ApoB (Akinc, et al., 2008; Ason, et al., 2011; Baigude, McCarroll, Yang, Swain, & Rana, 2007; Ghosn, et al., 2010; Judge, Bola, Lee, & MacLachlan, 2006; Lee, Park, et al., 2011; Nishina, et al., 2008; Rozema, et al., 2007; Soutschek, et al., 2004; Tadin-Strapps, et al., 2011; Wolfrum, et al., 2007; Zimmermann, et al., 2006). Cependant, la majorité de ces études ont mis l'accent sur l'efficacité de leur système de livraison sans considérer les effets potentiellement thérapeutiques de la livraison des siARN-ApoB. Ainsi, des nanoparticules chitosane/siARN-ApoB spécifiques à l'ARNm codant l'ApoB ont été utilisées dans le cadre de ce projet de recherche afin d'évaluer leurs effets préventifs et thérapeutiques dans un modèle murin d'athérosclérose.

CHAPITRE 1 REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 L'athérosclérose

1.1.1 Les aspects socio-économiques

L'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique qui se développe durant une longue période asymptomatique (Ohsfeldt, et al., 2010; Toth, 2008). L'athérosclérose est l'une des causes de mortalité les plus importantes au monde puisqu'elle est la source de plusieurs maladies et malaises tels les maladies coronariennes, les accidents vasculaires cérébraux, le syndrome coronarien aigu, l'angine de poitrine, l'infarctus du myocarde, l'insuffisance cardiaque et les maladies périphériques artérielles (Allender, et al., 2008; Lloyd-Jones, et al., 2010; Ohsfeldt, et al., 2010; Scarborough, et al., 2009; Toth, 2008). Les maladies cardiovasculaires correspondent à la cause de mortalité la plus importante au Canada, soit approximativement 75000 décès par année (Canadian Institutes of Health Research, 2009). En 2002, au moins 33 % des décès canadiens ont été associés aux maladies cardiovasculaires (Canadian Institutes of Health Research, 2007). Aux États-Unis, les maladies cardiovasculaires demeurent la cause de décès la plus importante depuis 1900, et ce, malgré une baisse du taux de mortalité observée depuis environ 15 ans (American Heart Association, 2010; Lloyd-Jones, et al., 2010). Pour l'année 2006, aux États-Unis, une personne sur trois est décédée suite à une maladie cardiovasculaire (American Heart Association, 2010; Lloyd-Jones, et al., 2010). En Europe, la moitié des décès survenus durant l'année 2008 sont dus aux maladies cardiovasculaires (Allender, et al., 2008). Ainsi, l'athérosclérose représente un problème d'envergure, tant du point de vue médical qu'économique.

En 2009-2010, le Canada a investi approximativement \$95,6 millions dans la recherche en santé cardiovasculaire à travers les Instituts de recherche en santé du Canada (Canadian Institutes of Health Research, 2011). Selon l'Agence de la santé publique du Canada, les maladies cardiovasculaires ont engendré des coûts directs de \$7,6 milliards et des coûts indirects de \$14,6 milliards, totalisant \$22,2 milliards pour l'année 2000 (Agence de la santé publique du Canada, 2009). Aux États-Unis, les coûts directs et indirects se sont élevés jusqu'à \$503,2 milliards pour l'année 2010 (Lloyd-Jones, et al., 2010). L'Union européenne n'échappe pas à la règle ayant

déboursé \$190 milliards pour l'année 2008 (Allender, et al., 2008). Ces sommes d'argent incluent non seulement des investissements dans le système de santé ou la médication, mais aussi les pertes d'argent occasionnées par l'absentéisme et la diminution de productivité.

1.1.2 Les facteurs de risque

Plusieurs facteurs de risques sont associés à l'athérosclérose, d'où son influence sur l'état de la santé mondiale. Le patrimoine génétique familial peut contribuer au développement de l'athérosclérose, spécifiquement par le développement de l'hypercholestérolémie familiale hétérozygote. L'hypercholestérolémie familiale est associée à l'héritage d'un taux très élevé de cholestérol et de lipoprotéines de faible densité mieux connues sous le nom de LDL (*low density lipoproteins*). Les taux élevés de LDL sont dus à une mutation au niveau du gène codant pour le récepteur de LDL (Austin, Hutter, Zimmern, & Humphries, 2004). Il existe d'autres facteurs de risque ayant une forte composante génétique tels qu'un niveau faible de lipoprotéines de haute densité (HDL : *high density lipoprotein*), un niveau élevé de lipoprotéines de faibles densités et de facteurs hémostatiques, le diabète, l'obésité, le sexe masculin et la pression artérielle élevée (Lusis, 2000). De plus, des facteurs de risque classiques tels que l'âge, une diète riche en gras, l'inactivité physique et l'usage de la cigarette sont fortement associés à l'athérosclérose (O'Donnell & Elosua, 2008; Toth, 2008). Des études démontrent une association entre l'athérosclérose et la pression sociale et économique sur les individus. Un faible niveau d'éducation est souvent associé avec un faible statut socio-économique et la pauvreté. Cette situation peut favoriser le contact avec les pathogènes athérogènes soit par de mauvaises conditions de vie durant l'enfance ou une mauvaise alimentation et un niveau de stress élevé. Ainsi, un faible niveau d'éducation scolaire corrèle grandement avec les chances d'être atteint de multiples pathogènes athérogènes, tels que les cytomégalovirus, le virus de l'herpès, le virus *C. pneumoniae* et le virus *H. pylori* (Aiello, et al., 2009).

1.1.3 L'athérogénèse causée par l'accumulation de LDL

L'augmentation graduelle de la concentration de lipoprotéines de faibles densités, les transporteurs de cholestérol, dans l'organisme correspond au point de départ de la réaction inflammatoire associée à l'athérosclérose. Les sites artériels propices au développement de l'athérosclérose sont situés où la contrainte de cisaillement créée par le sang est la plus élevée,

c'est-à-dire les coudes ou les branchements. Les sites artériels athérosclérotiques possèdent une paroi endothéliale très perméable contribuant à la diffusion passive des lipoprotéines de faibles densités à travers les jonctions des cellules endothéliales (CE) et à leur accumulation dans l'intima du vaisseau sanguin (Lusis, 2000). Le stress mécanique a aussi pour effet de stimuler la sécrétion de protéoglycanes par les cellules musculaires lisses (SMC : *smooth muscle cells*) (Libby, 2002). Ainsi, la matrice protéoglycane peut capturer les LDL en interagissant avec l'apolipoprotéine B (ApoB), la composante protéique LDL (Lusis, 2000).

1.1.4 Les conséquences de la modification des LDL

Les LDL retenues dans l'intima sont sujettes à des modifications telles que l'oxydation par des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS : *reactive oxygen species*), la glycation non enzymatique, la dégradation enzymatique et l'agrégation (Binder, et al., 2002). Ce sont les lipoprotéines de faible densité oxydées (oxLDL : *oxidized LDL*) et les lipoprotéines de faible densité minimalement modifiées (mmLDL : *minimally modified LDL*) qui activent la transcription des gènes codant pour des molécules d'adhésion vasculaire-1 (VCAM-1 : *vascular cell adhesion protein-1*), ainsi que les sélectines P et E. Les VCAM-1 et les sélectines P et E contribuent à l'extravasation de monocytes dans l'intima artérielle. Cette activation se fait par l'entremise des cytokines pro-inflammatoires interleukine-1 β (IL-1 β) et facteurs de nécrose tumorale- α (TNF- α : *tumor necrosis factor- α*) dans les CE (Libby, 2002). L'oxydation des LDL permet aussi aux CE de sécréter des chimiokines, comme les protéines chimiotactiques de monocytes-1 (MCP-1 : *monocyte chemotactic protein-1*). Les MCP-1 peuvent attirer des monocytes et induire l'expression de facteur de croissance pro-athérogènes ainsi que les facteurs stimulant la prolifération des macrophages (M-CSF : *macrophage-colony stimulating factor*) (Binder, et al., 2002). De plus, les oxLDL contribuent également à l'inhibition de l'oxyde nitrique, un médiateur chimique antiathérogène pouvant vasorelaxer les vaisseaux sanguins (Lusis, 2000). Les oxLDL peuvent aussi augmenter la prolifération des SMC et induire l'apoptose aux sites athérosclérotiques, contribuant donc au développement de la strie lipidique (Paoletti, et al., 2004).

1.1.5 Le recrutement des monocytes

L'attraction des monocytes à la paroi endothéliale artérielle correspond à une étape cruciale de l'immunité innée. La migration des monocytes à travers la barrière endothéliale se fait par

extravasation. Tout d'abord, il y a la rétention des monocytes par l'interaction de leurs antigènes d'activation tardive-4 (VLA-4 : *very late activation antigen*) et les VCAM-1 des CE. Ensuite, il y a un roulement vers la jonction des CE qui est facilité par les sélectines P et E. À leur arrivée dans la région subendothéliale, les monocytes captent les MCP-1 avec leurs récepteurs de chimiokines à motif C-C 2 (CCR2 : *chemokine (C-C motif) receptor 2*) (Libby, 2002; Libby, et al., 2002).

1.1.6 La transformation des macrophages

À travers la liaison entre les MCP-1 et les CCR2 et l'implication des M-CSF, les monocytes peuvent se diviser et se différencier en macrophages (Hansson, 2005; Libby, 2002; Libby, et al., 2002; Lusis, 2000). Les M-CSF peuvent aussi promouvoir leur sécrétion, ainsi que celle de cytokines pro-inflammatoires, amplifiant de manière exponentielle la production de macrophages (Libby, 2002). Les macrophages sont très importants pour l'immunité innée étant donné leur production de ROS, de protéases et de cytokines pro-inflammatoires. Toutefois, le rôle le plus important des M-CSF est la stimulation de l'expression de récepteurs de surface sur les macrophages communément appelés les récepteurs éboueurs (SR : *scavenger receptor*). Les SR, comprenant les récepteurs éboueurs-A (SR-A : *scavenger receptor-A*) et les groupes de différenciation 36 (CD36 : *cluster of differentiation 36*), captent les oxLDL et les internalisent, transformant les macrophages en cellules mousseuses (FC : *foam cells*) (Binder, et al., 2002; Hansson, 2005; Libby, 2002; Lusis, 2000; Spagnoli, et al., 2007). Dans cette situation, les oxLDL agissent tel un « cheval de Troie » transportant le cholestérol à l'intérieur des macrophages. Lorsque les FC sont saturées d'oxLDL, le surplus d'oxLDL s'accumule dans l'intima sous forme de gouttelettes contribuant au développement du cœur nécrotique (Hansson, 2005).

1.1.7 L'autosuffisance de l'athérosclérose

Les leucocytes activés s'accumulent dans l'intima et les cellules formant le site athérosclérotique peuvent sécréter des médiateurs fibrogéniques contribuant à la division des SMC. L'accroissement du nombre de ces cellules a pour effet d'augmenter la synthèse de matrice protéolytique, ce qui cause une plus grande capture de LDL (Libby, 2002). Ce phénomène participe grandement au développement de la lésion athérosclérotique, puisque l'accumulation exponentielle de LDL alimente le cycle autosuffisant de la réaction inflammatoire.

1.1.8 L'immunité acquise cellulaire impliquée dans l'athérogénèse

L'immunité acquise joue aussi un rôle important dans l'athérogénèse. D'une manière similaire aux monocytes, les lymphocytes T et B sont captés par les VCAM-1 et pénètrent dans l'intima par extravasation. La migration des lymphocytes T est régulée par des chimiokines de la famille des CXC (cystéine X cystéine), telles que les protéines-10 inductibles (IP-10 : *inductible protein-10*), les monokines inductibles par les interférons- γ (IFN- γ) (Mig : *monokine induced by IFN- γ*) et les chimioattractants- α de cellules T inductibles par les interférons (I-TAC : *interferon-inductible T cell α -chemoattractant*) (Libby, Okamoto, Rocha, & Folco, 2010; Libby, et al., 2002). Les IP-10, les Mig et les I-TAC sont captées par les récepteurs-3 de CXC (CXCR3 : *CXC receptor-3*) permettant aux lymphocytes T, majoritairement des lymphocytes T auxiliaires CD4⁺ (Th : *T helper cell*), de rester dans l'intima (Binder, et al., 2002; Spagnoli, et al., 2007). Ainsi, les lymphocytes T sont en mesure de capter les antigènes impliqués dans la réaction immunitaire innée comme les oxLDL, par l'entremise du complexe d'histocompatibilité majeur de classe II (MHCII : *major histocompatibility complex II*) présent à la surface des CE, des macrophages, des SMC et des lymphocytes B (Spagnoli, et al., 2007). La liaison entre les oxLDL et les MHCII a des effets notables sur les cellules impliquées dans le développement de la plaque athérosclérotique en amplifiant le cycle autosuffisant de la réaction inflammatoire. Par l'intermédiaire des cytokines présentes dans l'intima, les lymphocytes Th se différencient en lymphocytes Th1 et Th2 sécrétant des cytokines pro-inflammatoires (IFN- γ , IL-2 et TNF- α) et anti-inflammatoires (IL-4, IL-5 et IL-10), respectivement (Binder, et al., 2002; Hansson, 2005; Libby, 2002). Toutefois, la quantité de lymphocytes Th1 excède largement celle des lymphocytes Th2, laissant l'effet antiathérogène de ces dernières pratiquement nul.

1.1.9 L'aspect antiathérogène de l'immunité acquise humorale

Suite à la présentation des oxLDL, les cytokines sécrétées par les lymphocytes Th permettent la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes produisant des anticorps (Ac) spécifiques aux oxLDL. Les Ac peuvent ainsi participer à l'activation du complément, initié par les protéines réactives-C (CRP : *C-reactive protein*) (Paoletti, et al., 2004). Malgré les caractéristiques antiathérogènes du complément et des Ac, elles ne suffisent pas à contrer la croissance

exponentielle de la plaque athérosclérotique menée par les réactions immunitaires innées et les réactions immunitaires acquises cellulaires.

1.1.10 Le point culminant du développement athérosclérotique

L'expansion athérosclérotique atteint le point culminant de l'athérosclérose par l'interaction entre les facteurs co-stimulants CD40 des macrophages, induits par des IFN- γ , et les ligands CD40L (CD154) des lymphocytes T. La liaison entre les CD40 et les CD40L mène à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, de facteurs tissulaires (TF : *tissue factor*) et de métalloprotéinases de matrice (MMP : *matrix metalloproteinase*). Les IFN- γ et les MMP fragilisent la chape fibreuse séparant le cœur nécrotique et le sang circulant dans la lumière de l'artère (Binder, et al., 2002; Libby, 2002; Libby, et al., 2010; Lusis, 2000; Spagnoli, et al., 2007). Les MMP dégradent le collagène tandis que les IFN- γ inhibent la production de collagène, diminuant grandement la rigidité structurelle des cellules formant la chape fibreuse (Hansson, 2005; Libby, 2002; Libby, et al., 2002; Lusis, 2000; Spagnoli, et al., 2007). Les chapes fibreuses les plus fragiles sont très minces et subissent une pression importante par le nombre très élevé de cellules inflammatoires et de gouttelettes d'oxLDL dans l'intima. Par la suite, l'augmentation de la contrainte de cisaillement sur la paroi de l'artère peut occasionner une rupture de la chape fibreuse. Cette rupture cause le déversement du cœur nécrotique dans l'artère, mettant en contact les facteurs de coagulation du sang et les TF de l'intima. Ce contact permet l'amorce de la cascade de coagulation et la production de thrombines activant les plaquettes formant la thrombose (Libby, 2002). Bref, la thrombose est la conséquence potentiellement mortelle du cycle autosuffisant exponentiel de l'athérosclérose et l'amorce de plusieurs maladies cardiovasculaires.

1.2 Les lipoprotéines et les apolipoprotéines

1.2.1 La nature des lipoprotéines

Sachant que les LDL sont omniprésentes autant dans l'initiation de l'athérosclérose que lors du développement exponentiel de cette maladie, il est important de connaître leur nature athérogène. Les lipoprotéines sont des macromolécules pseudomicelliques solubles dans l'eau composées d'un cœur lipidique et d'une couche de lipides amphiphiles (Bricarello, Smilowitz, Zivkovic, German, & Parikh, 2010; Mahley, et al., 1984; Olofsson & Boren, 2005). Plus précisément, le

cœur lipidique contient des triglycérides et/ou du cholestérol estérifié, tandis que la couche amphiphile est composée de phospholipides, de cholestérol et d'une ou plusieurs apolipoprotéines (Bricarello, et al., 2010; Olofsson & Boren, 2005) , comme l'illustre la Figure 1-1. Les lipoprotéines sont responsables du transport systémique du cholestérol.

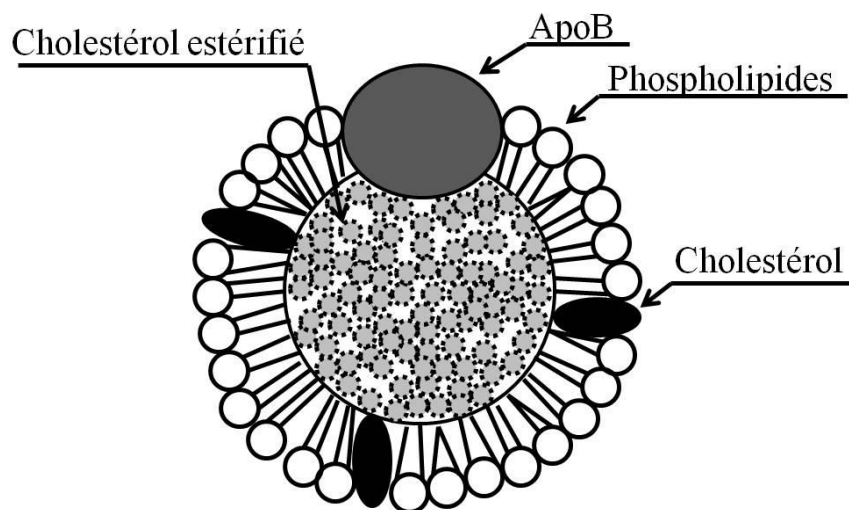


Figure 1-1: Structure d'une lipoprotéine de faible densité (LDL)

1.2.2 Les familles de lipoprotéines athérogènes

Il existe plusieurs familles de lipoprotéines athérogènes se différenciant par leurs tailles et leurs densités en cholestérol. Le rôle des lipoprotéines athérogènes est de transporter le cholestérol estérifié et/ou les triglycérides du foie vers différents tissus, dont les tissus adipeux (Mahley, et al., 1984). Ainsi, des plus grosses lipoprotéines aux plus petites, il existe les chylomicrons, les lipoprotéines de très faible densité (VLDL : *very low density lipoprotein*), les lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL : *intermediate density lipoprotein*) et les lipoprotéines de faible densité (LDL : *low density lipoprotein*) (Mahley, et al., 1984). Plusieurs LDL de petites tailles contribuent davantage au développement de l'athérosclérose que quelques VLDL de grandes tailles (Véniant, et al., 1997). Par conséquent, le risque d'athérosclérose corrèle avec le nombre total de lipoprotéines athérogènes pénétrant dans l'intima de l'artère plutôt que la quantité de cholestérol transportée par chaque lipoprotéines (Benn, 2009).

1.2.3 La corrélation entre les lipoprotéines athérogènes et les ApoB

L'athérogénicité des lipoprotéines de faibles densités repose sur l'interaction entre l'ApoB et la matrice protéoglycane et les macrophages présents dans l'intima. L'ApoB est un meilleur facteur de risque de l'athérosclérose comparativement à la concentration de cholestérol, puisque chaque lipoprotéine de faible densité ne comporte qu'une macromolécule d'ApoB. Walldius *et al.* ont mis en évidence un rapport de 0,80 à 0,85 (nombre d'ApoB/quantité de cholestérol) entre l'ApoB et le cholestérol contenu dans les lipoprotéines athérogènes (Walldius & Jungner, 2006). Ainsi, la concentration de l'ApoB reflète la quantité de particules de LDL, IDL et VLDL en circulation et non la quantité de cholestérol transporté par ces lipoprotéines athérogènes (Benn, 2009; Motta, et al., 2008; Vaverkova, et al., 2009; Walldius & Jungner, 2006).

1.2.4 Le rôle de l'ApoB et la formation des lipoprotéines

L'ApoB est une glycoprotéine de haute masse molaire impliquée dans le transport et la redistribution des lipides parmi différents tissus. L'ApoB agit comme cofacteur enzymatique dans la synthèse des lipides et il fournit l'intégrité structurelle des lipoprotéines de faibles densités (Chiodini, et al., 2003; Mahley, et al., 1984; Motta, et al., 2008; Olofsson & Boren, 2005; Walldius & Jungner, 2006). La redistribution des lipides dans l'organisme repose sur l'interaction entre l'ApoB et les récepteurs de LDL (LDLr : *LDL receptor*). Les LDLr présents sur les cellules hépatiques maintiennent l'homéostasie des LDL dans l'organisme (Benn, 2009; Chiodini, et al., 2003; Liao & Ning, 2006; Mahley, et al., 1984; Twisk, et al., 2000; Vaverkova, et al., 2009; Yang, et al., 1989). Le foie peut cataboliser 60 à 75 % des LDL nouvellement formées (Mahley, et al., 1984; Twisk, et al., 2000). À cet égard, une personne atteinte d'hypercholestérolémie familiale catabolise les LDL avec beaucoup plus de difficultés (Twisk, et al., 2000). L'élimination des LDL implique la dégradation de l'ApoB. Toutefois, certaines formes d'ApoB sont plus propices à la dégradation, dépendamment des domaines reconnus par les LDLr (Twisk, et al., 2000).

1.2.5 La régulation des formes de l'ApoB

L'organisme humain possède deux formes principales d'ApoB, l'ApoB100 et l'ApoB48 sécrétées dans le foie et l'intestin respectivement. Il est important de noter que chez les rongeurs

l'ApoB48 est sécrétée par le foie et l'intestin (Liao & Ning, 2006). L'ApoB100 est présente dans les VLDL, IDL et LDL, tandis que l'ApoB48 se retrouve dans les chylomicrons (Benn, 2009; Liao & Ning, 2006; Mahley, et al., 1984; Olofsson & Boren, 2005; Walldius & Jungner, 2006). Les formes de l'ApoB sont codées par le même gène. De ce fait, l'acide ribonucléique messager (ARNm) de l'ApoB48 est créé à partir de l'ARNm de l'ApoB100 par un procédé d'édition permettant la désamination d'une cytidine spécifique en une uridine transformant le codon codant pour la glutamine en un codon STOP (Crooke, et al., 2005; Olofsson & Boren, 2005). D'où le nom d'ApoB48, cette dernière correspondant à 48 % de l'ApoB100. Les deux formes d'ApoB partagent donc la même extrémité N-terminale, mais l'ApoB48 ne possède pas l'extrémité C-terminale de l'ApoB100 responsable de la liaison avec les LDLr (Olofsson & Boren, 2005). Comparativement à l'ApoB48, l'ApoB100 est plus sujette à la dégradation vu les domaines qu'elle possède. Par contre, la dégradation de l'ApoB100 ne dépend pas uniquement de la réabsorption des LDL par les LDLr. En effet, l'ApoB100 peut aussi être dégradée lors de sa biosynthèse suivant sa migration dans le cytosol par son ubiquitination et sa dégradation subséquente par un protéasome (Olofsson & Boren, 2005). La dégradation se produit dépendamment du niveau de lipides ou de protéines de transfert de triglycérides microsomaux (MTP : *microsomal triglyceride transfer protein*), tous deux impliqués dans la génération de lipoprotéines athérogènes (Olofsson & Boren, 2005). Alors, si la quantité de lipides ou de MTP est trop élevée dans le foie, les ApoB100 ne seront pas dégradées favorisant ainsi la formation de lipoprotéines athérogènes. Malgré les processus de dégradation de l'ApoB100, sa quantité en circulation est beaucoup plus importante que celle de l'ApoB48, ce qui implique que le terme normalement employé pour désigner l'apolipoprotéine B est ApoB, sans spécifier la forme ApoB100 (Walldius & Jungner, 2006).

1.2.6 Les facteurs endogènes antiathérogènes

Les HDL correspondent à une famille de lipoprotéines antiathérogènes. En effet, les HDL contribuent au transport inversé du cholestérol impliquant le transport du cholestérol des tissus périphériques jusqu'au foie. Les HDL sont absorbées par le foie par l'entremise des récepteurs éboueurs de classe B, de type I (SR-BI : *scavenger receptor class B member I*). Le cholestérol retourné au foie par les HDL est excrété dans la bile. (Assmann & Gotto, 2004; Mahley, et al., 1984). Par conséquent, un niveau faible de HDL implique un catabolisme de cholestérol

amoindri, ce qui mène à l'accumulation excessive de cholestérol dans les tissus périphériques. De plus, les HDL peuvent prévenir l'induction des VCAM-1, ce qui ralentit le recrutement de monocytes aux sites athérosclérotiques. Les HDL sont aussi en mesure de contrer l'oxydation des LDL et l'inhibition de l'oxyde nitrique (Stein & Stein, 1999). L'équilibre entre le nombre de LDL athérogènes et de HDL antiathérogènes est essentiel à la préservation d'un système cardiovasculaire sain. Sachant que l'apolipoprotéine A-I (ApoA-I) est la composante protéique principale des HDL, l'équilibre entre les LDL et les HDL est étudié à travers le ratio ApoB/ApoA-I. Un ratio ApoB/ApoA-I élevé est considéré comme étant un facteur de risque lié au développement des maladies cardiovasculaires (Walldius & Jungner, 2006).

En plus de l'ApoA-I, l'apolipoprotéine E (ApoE) est aussi considérée comme étant antiathérogène. La majorité des ApoE sont sécrétées par le foie afin de former des dérivés de HDL riches en cholestérol pouvant faire le transport inversé de cholestérol (Dergunov, 2011; Greenow, Pearce, & Ramji, 2005; Mahley, et al., 1984). De plus, les ApoE peuvent aussi être sécrétées par les macrophages présents dans les plaques athérosclérotiques afin de freiner l'accumulation de cholestérol dans l'intima (Stein & Stein, 1999). Étant donné l'affinité des ApoE pour les LDLr et les récepteurs d'ApoE, les HDL contenant l'ApoE sont facilement catabolisées par les cellules hépatiques favorisant donc l'homéostasie du cholestérol dans l'organisme. Ainsi, les souris déficientes en ApoE sont hypercholestérolémiques et elles développent des plaques athérosclérotiques très complexes. Ces souris correspondent au modèle murin le plus utilisé dans l'étude de l'athérosclérose (Greenow, et al., 2005). L'ApoE est aussi en mesure de former des dérivés de VLDL très riches en cholestérol par l'entremise de vestiges de lipoprotéines. Ainsi, ces dérivés de VLDL contenant une ApoE peuvent contribuer à l'homéostasie du cholestérol dans l'organisme par leur liaison avec les LDLr hépatiques. Puisque les VLDL transportent une très grande quantité de cholestérol contrairement aux LDL, le catabolisme des LDL très athérogènes est ralenti, favorisant l'athérogénèse (Dergunov, 2011).

Étant donné l'importance de l'ApoB dans l'initiation et le développement de l'athérosclérose, cette apolipoprotéine correspond à un choix idéal pour le traitement de l'athérosclérose. Aucune drogue sur le marché ne cible la source de l'athérosclérose. Les médicaments disponibles favorisent surtout le ralentissement du développement athérosclérotique en agissant sur les molécules effectrices de l'athérosclérose. Par exemple, les statines permettent de diminuer le

niveau de cholestérol en inhibant l'enzyme réductase 3-hydroxy-3-méthyl-glutaryl-coenzyme A (HMG-CoA), une enzyme contrôlant le taux de métabolisme du cholestérol (Kang, Wu, & Li, 2004). Malgré l'efficacité des statines et leur grande utilisation, ces dernières ne correspondent pas à un traitement de l'athérosclérose, mais plutôt à un outil permettant la gestion du développement de l'athérosclérose. Ceci est aussi vrai pour les fibrates, dérivés d'acides fibriques, dont l'action sur les récepteurs de forme- α activés de la prolifération des peroxysomes (PPAR- α : *peroxysome proliferator activated receptor of the α isoform*) régule à la hausse les HDL (Nichols, Koro, Chan, Bowlin, & Sprecher, 2006). Par conséquent, l'utilisation de fibrates ne cible aucunement la source de l'athérosclérose et ne sert qu'à balancer l'augmentation de LDL en circulation. Il est donc important de développer de nouveaux traitements pour l'athérosclérose qui ciblerait une protéine, telle que l'ApoB, responsable de l'initiation et de l'évolution de l'athérosclérose. De nouvelles voies thérapeutiques révolutionnaires permettant de cibler et d'inhiber l'expression de gènes impliqués dans différentes maladies ont vu le jour suite à la découverte de l'interférence par ARN (ARNi).

1.3 Les principes et défis de l'ARNi

1.3.1 Historique de l'ARNi

Depuis la découverte de l'interférence génique causée par les ARN double brins (ARNdb) dans les nématodes *Caenorhabditis elegans* par Andrew Fire et Craig Mello en 1998, une quantité impressionnante de publications, ainsi que de nombreuses innovations ont été réalisées dans un très court laps de temps. Les travaux révolutionnaires d'Andrew Fire et Craig Mello leur ont valu un prix Nobel en physiologie ou médecine en 2006. En effet, cette découverte a démontré la possibilité d'interférer dans l'expression d'un gène endogène par la liaison et la dégradation éventuelle de l'ARNm par l'administration d'ARNdb (Fire, et al., 1998). En 2001, Elbashir *et al.* ont identifié les médiateurs du silençage génique comme étant des siARN, des petits ARN interférents d'environ 21-23 nucléotides en duplex possédant un potentiel d'inhibition génique élevé dans les cellules de mammifères (Elbashir, Lendeckel, & Tuschl, 2001).

1.3.2 Les enjeux de la thérapie génique par ARNi

Les avantages de l'utilisation de l'ARNi sont la grande spécificité, le choix quasi-illimité de séquences cibles d'ARNm et la précision des thérapies pouvant découler du silençage génique (Aagaard & Rossi, 2007). Toutefois, le transport d'ARN interférents exogènes correspond à un défi de taille, étant donné leur susceptibilité à la dégradation par des nucléases en circulation dans le système sanguin. De plus, la livraison d'ARN interférents exogènes peut mener à des réactions immunitaires, à une compétition avec les ARN interférents endogènes et/ou un silençage génique non-spécifique (Aagaard & Rossi, 2007). Malgré les nombreux défis de l'ARNi, des idées innovatrices ont été élaborées dans le but de surpasser les limites de cette technologie et de tirer profit de nombreux avantages.

1.3.3 Les mécanismes de l'ARNi

1.3.3.1 La voie endogène d'ARNi : miARN

1.3.3.1.1 Nature des miARN

Avant toute chose, le phénomène d'ARNi est une voie endogène de défense contre les virus et la mobilisation d'éléments génétiques transposables (transposons) menée par les micro-ARN (miARN) dans la plupart des cellules eucaryotes (Aagaard & Rossi, 2007; Dorsett & Tuschl, 2004; Leung & Whittaker, 2005; Meister & Tuschl, 2004; Novina & Sharp, 2004; Thomas, et al., 2004). Les miARN sont des ARNdb d'environ 22 nucléotides de longueur pouvant ajuster précisément l'expression génique de protéines durant le développement et la différenciation cellulaire par répression traductionnelle (Kim & Rossi, 2007; Meister & Tuschl, 2004; Raemdonck, et al., 2008). La voie endogène d'ARNi entreprise par les miARN est résumée à la Figure 1-2.

1.3.3.1.2 Processus de silençage génique par répression traductionnelle

La voie endogène de silençage génique débute dans le noyau avec la transcription des micro-ARN primaires (pri-miARN) par l'ARN polymérase II. Les pri-miARN sont ensuite traités par la ribonucléase III (ARNase III) (Drosha) complexée à la protéine de région critique DiGeorge 8 (DGCR8 : *DiGeorge critical region 8*) afin de créer des micro-ARN précurseurs (pré-miARN)

ayant une structure en épingle à cheveux d'environ 70 nucléotides (Aagaard & Rossi, 2007; Leung & Whittaker, 2005; Raemdonck, et al., 2008). Les pré-miARN migrent dans le cytoplasme par l'entremise de l'exportine 5 où ils sont transformés en miARN matures grâce à l'ensemble composé de l'ARNase/protéine Dicer, la protéine de liaison d'ARN TAR (TRBP : *TAR RNA binding protein*) et la protéine activatrice de la protéine kinase induite par interféron (PACT : *protein activator of the interferon induced protein kinase*). Les miARN sont subséquemment chargés dans les complexes composés de l'argonaute 2 (AGO2) et du complexe de silençage induit par l'ARN (RISC : *RNA-induced silencing complex*) (AGO2/RISC). Suite au déroulement des miARN par l'activité d'une hélicase, leur brin sens est rejeté, ce qui active le complexe RISC. L'activation du complexe RISC permet à la séquence clé du brin antisens (nucléotides 2-7 à partir de l'extrémité 5') de se lier à la région non-traduite 3' (3'UTR : *3' untranslated region*) de l'ARNm ciblé. Cette liaison entre le brin antisens et l'ARNm induit la répression traductionnelle de l'ARNm menant à son éventuelle dégradation (Aagaard & Rossi, 2007; de Fougères, et al., 2007; Dorsett & Tuschl, 2004; Dykxhoorn, et al., 2003; Kim & Rossi, 2007; Meister & Tuschl, 2004; Raemdonck, et al., 2008; Shiri & Dan, 2010). La complémentarité partielle entre les miARN et les ARNm permet l'inhibition de l'expression de plusieurs séquences d'ARNm différentes (Novina & Sharp, 2004; Shiri & Dan, 2010).

1.3.3.2 Voie exogène d'ARNi : siARN

1.3.3.2.1 Créer le silençage génique post-transcriptionnel

Les siARN exogènes peuvent induire le silençage post-transcriptionnel de manière spécifique dans les cellules de mammifères (Elbashir, et al., 2001). Pour ce faire, les siARN doivent être livrés aux cellules contenant l'ARNm cible. Contrairement aux miARN, les siARN ne requièrent aucune préparation antérieure dans le noyau. Par conséquent, les siARN doivent atteindre le cytoplasme des cellules pour entrer en contact avec la machinerie protéique impliquée dans le silençage génique post-transcriptionnel.

1.3.3.2.2 L'utilisation d'ARNdb et de siARN exogènes

Des ARNdb peuvent être synthétisés en laboratoire et subséquemment livrés dans les cellules cibles pour être reconnus par une endonucléase de la famille des ARNase III appelée Dicer.

Effectivement, les ARNdb exogènes sont transformés en siARN par le complexe composé de Dicer, TRBP et PACT favorisant le chargement des siARN nouvellement produits dans le complexe AGO2/RISC (Aagaard & Rossi, 2007; Akhtar & Benter, 2007b; Kim & Rossi, 2007; Raemdonck, et al., 2008; Thomas, et al., 2004). Ces siARN ont une longueur de 21-23 paires de bases avec un dépassement de 2 nucléotides à l'extrémité 3' (Kim & Rossi, 2007; Shiri & Dan, 2010), ce qui leur permet de se faire reconnaître par la machinerie de l'ARNi (Aagaard & Rossi, 2007; Meister & Tuschl, 2004; Thomas, et al., 2004). Le mécanisme d'ARNi induit par les ARNdb et les siARN est présenté à la Figure 1-2. Il a été démontré que l'utilisation des ARNdb ayant plus de 30 nucléotides de longueur peut amorcer une réaction immunitaire innée (Aagaard & Rossi, 2007; Aigner, 2007; Lee, Mok, Jo, Hong, & Park, 2011). Cette réponse immunitaire dirigée par les récepteurs de type Toll-3 (TLR : *toll-like receptor*) est amorcée par l'activation de la protéine kinase (PKR : *protein kinase RNA-activated*), amenant des effets non-spécifiques dans l'organisme (Aagaard & Rossi, 2007; Alexopoulou, Holt, Medzhitov, & Flavell, 2001; Dykxhoorn, et al., 2003; Kim & Rossi, 2007; Thomas, et al., 2004).

Ainsi afin de contourner l'utilisation des ARNdb, des siARN exogènes sont synthétisés en laboratoire et sont livrés directement aux cellules. L'utilisation des siARN est préconisée par les chercheurs. Leur utilisation permet de minimiser les effets non-spécifiques créés par les longs ARNdb (Aigner, 2007; Leung & Whittaker, 2005; Thomas, et al., 2004) ainsi que le surmenage des complexes Dicer impliqués dans la voie de silençage génique endogène menée par les miARN (Aagaard & Rossi, 2007). Les siARN peuvent être conçus de manière à imiter les siARN produits suite au clivage des ARNdb par Dicer et optimisés pour augmenter l'efficacité de silençage génique.

Lorsque les siARN exogènes atteignent le cytoplasme des cellules ciblées, ils sont incorporés aux complexes AGO2/RISC. Cependant, le chargement des siARN dans les complexes AGO2/RISC est plus efficace lorsque les siARN sont guidés par le complexe Dicer (Dykxhoorn, et al., 2003; Kim & Rossi, 2007; Raemdonck, et al., 2008). Par conséquent, certains chercheurs tentent de tirer profit des avantages de l'utilisation des ARNdb et des siARN synthétiques exogènes en livrant des ARNdb ayant une longueur entre 23 et 30 nucléotides. L'utilisation d'ARNdb plus court permettrait de contourner les réactions immunitaires et impliquerait le traitement par Dicer

favorisant le chargement des siARN dans les complexes AGO2/RISC (Aagaard & Rossi, 2007; Raemdonck, et al., 2008).

1.3.3.2.3 *Brin guide et le complexe AGO2/RISC*

Le complexe AGO2/RISC ne peut contenir qu'un seul brin. Ce brin devient le guide dirigeant la recherche de la séquence cible d'ARNm (Dykxhoorn, et al., 2003; Kim & Rossi, 2007; Raemdonck, et al., 2008). La sélection de brin guide s'arrête sur le brin antisens puisque son instabilité thermodynamique à l'extrémité 5' lui permet de pénétrer dans le RISC (Aagaard & Rossi, 2007; Akhtar & Benter, 2007b; Dykxhoorn, et al., 2003; Leung & Whittaker, 2005; Meister & Tuschl, 2004). À l'opposé, la haute stabilité de l'extrémité 5' du brin sens, considéré comme le brin passager, empêche sa prise en charge par RISC. Après l'entrée du brin guide dans RISC, AGO2 est en mesure de cliver le brin passager du siARN, ce qui active RISC (Aagaard & Rossi, 2007; Akhtar & Benter, 2007b; de Fougérolles, et al., 2007; Kim & Rossi, 2007; Raemdonck, et al., 2008). Le rejet du brin passager prévient des effets non-spécifiques, car la séquence du brin passager est identique à celle de l'ARNm cible, au lieu d'être complémentaire (Leung & Whittaker, 2005; Novina & Sharp, 2004). Le brin guide demeure lié à l'AGO2 par l'entremise de la liaison des extrémités 5' et 3' du brin guide avec les domaines PIWI (*P-element induced wimpy testis*) et PAZ (*piwi-argonaute-zwille*) de l'AGO2, respectivement (Aagaard & Rossi, 2007; Kim & Rossi, 2007; Meister & Tuschl, 2004).

1.3.3.2.4 *Clivage de l'ARNm cible*

Le silençage génique post-transcriptionnel exige un appariement de base Watson-Crick parfait ou quasi-parfait entre le brin guide et la séquence d'ARNm ciblée (Aagaard & Rossi, 2007; Kim & Rossi, 2007; Meister & Tuschl, 2004). Le clivage de l'ARNm est dirigé par AGO2 et se fait entre les bases 10 et 11 à partir de l'extrémité 5' du brin guide (Aagaard & Rossi, 2007; de Fougérolles, et al., 2007; Dorsett & Tuschl, 2004; Dykxhoorn, et al., 2003; Kim & Rossi, 2007; Meister & Tuschl, 2004; Raemdonck, et al., 2008). Le fragment d'ARNm clivé se fait subséquentement dégrader par des exonucléases présentes dans le cytoplasme puisque ses extrémités sont non protégées (Aigner, 2007). Le complexe AGO2/RISC actif, contenant le brin guide, peut poursuivre le clivage d'ARNm cible dans le cytoplasme (Aigner, 2007; de

Fougerolles, et al., 2007; Dykxhoorn, et al., 2003; Kim & Rossi, 2007; Leung & Whittaker, 2005; Raemdonck, et al., 2008; Shiri & Dan, 2010; Thomas, et al., 2004).

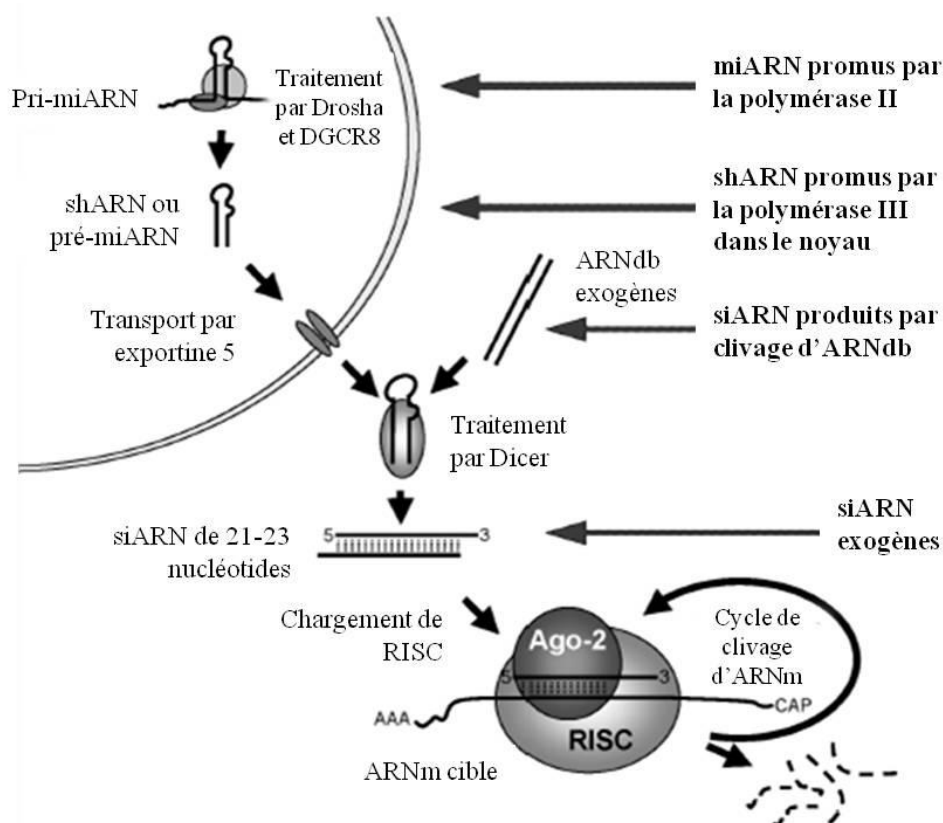


Figure 1-2 : Mécanisme de silençage génique post-transcriptionnel et molécules effectrices de l'ARNi (adapté d'Aagaard & Rossi, 2007)

1.3.3.3 La voie exogène d'ARNi : vecteur d'expression

1.3.3.3.1 Les alternatives aux siARN

Le silençage génique post-transcriptionnel induit par les siARN est transitoire étant donné la dilution intracellulaire des siARN due à la division constante des cellules (Dorsett & Tuschl, 2004; Dykxhoorn & Lieberman, 2006; Dykxhoorn, et al., 2003; Kim & Rossi, 2007; Lee & Kumar, 2009; Leung & Whittaker, 2005; Raemdonck, et al., 2008; Takahashi, Nishikawa, & Takakura, 2009). Ce qui signifie que la livraison d'une plus grande quantité de siARN peut augmenter l'efficacité et la durée du silençage génique (Lee & Kumar, 2009). Par contre, l'utilisation de doses de siARN très élevées est toxique pour la cellule. Alors, plusieurs

chercheurs étudient l'utilisation de petits ARN épingle à cheveux (shARN : *short hairpin RNA*) dans le but de générer une inhibition génique stable à long terme reposant sur un vecteur d'expression permettant la transcription constante des shARN dans le noyau cellulaire (Dorsett & Tuschl, 2004; Kim & Rossi, 2007; Lee & Kumar, 2009; Leung & Whittaker, 2005; Raemdonck, et al., 2008). Le mécanisme d'ARNi induit par les shARN est résumé par la Figure 1-2.

1.3.3.3.2 *Les vecteurs d'expression non viraux*

À la base, un vecteur d'expression contenant les séquences des shARN comporte un promoteur polymérase III (Pol III) suivi d'au moins 19 nucléotides, une boucle de 4 à 10 bases, la séquence de nucléotides complémentaire à la précédente et un terminateur de 4 à 6 uridines (Aagaard & Rossi, 2007; Dykxhoorn, et al., 2003). La conception d'un vecteur d'expression capable de transcrire des siARN implique l'utilisation de deux promoteurs qui permettent l'expression séparée de deux courts brins d'ARN pouvant ultérieurement s'hybrider afin de former un siARN dans le noyau (Aagaard & Rossi, 2007; Dykxhoorn, et al., 2003; Leung & Whittaker, 2005). Suite à leur transcription, les shARN et les siARN sont exportés dans le cytoplasme par l'exportine 5. Ensuite, les shARN sont clivés par Dicer afin de former des siARN, tandis que les siARN provenant du noyau sont pris en charge par le complexe RISC (Aagaard & Rossi, 2007).

Toutefois, des niveaux de transcription de shARN élevés peuvent saturer la voie endogène d'ARNi des miARN (Aagaard & Rossi, 2007; Kim & Rossi, 2007; Raemdonck, et al., 2008; Takahashi, et al., 2009) et peuvent causer de la toxicité par l'inhibition génique excessive de séquences d'ARNm essentielles à la survie cellulaire. Des chercheurs ont donc mis au point des promoteurs pouvant répondre à certains inducteurs, tels que des molécules pharmaceutiques exogènes ou des molécules endogènes associées à l'évolution d'une maladie, de manière à contrôler la transcription des shARN (Aagaard & Rossi, 2007; Lee & Kumar, 2009; Raemdonck, et al., 2008; Thomas, et al., 2004). Toutefois, la livraison des vecteurs d'expression dans le noyau cellulaire correspond à un obstacle important dans la transcription de shARN. En effet, la livraison des vecteurs d'expression est plus difficile que la livraison de siARN synthétiques car en plus de devoir pénétrer le cytoplasme et probablement s'échapper des endosomes, les vecteurs doivent se faire transporter au-delà de la membrane nucléaire (Raemdonck, et al., 2008; Takahashi, et al., 2009).

1.3.3.3 Vecteurs viraux

Il existe plusieurs vecteurs viraux pouvant être utilisés pour la transcription de shARN, tels que les vecteurs adénoviraux, rétroviraux, lentiviraux ou dérivés de virus adéno-associés (Aagaard & Rossi, 2007; Dorsett & Tuschl, 2004; Lee & Kumar, 2009; Leung & Whittaker, 2005; Raemdonck, et al., 2008; Thomas, et al., 2004). Les vecteurs viraux possèdent la meilleure efficacité de livraison intracellulaire à long-terme (Leung & Whittaker, 2005; Raemdonck, et al., 2008; Shiri & Dan, 2010). En revanche, l'utilisation de vecteurs viraux est une source importante de questionnement vu leur immunogénicité (Akhtar & Benter, 2007b; Kim & Rossi, 2007; Raemdonck, et al., 2008; Shiri & Dan, 2010; Takahashi, et al., 2009; Xu & Anchordoquy, 2011). De plus, d'un point de vue technique, les vecteurs viraux ont une capacité limitée de transport d'acides nucléiques et peuvent être difficiles à produire comparativement à des systèmes de livraison non-viraux (Chu, Miller, & Heistad, 2007). Enfin, malgré les avantages de l'ARNi basée sur les vecteurs d'expression, des problèmes tels que l'inactivation génique due à l'insertion génomique aléatoires de transgènes menant à la mutagenèse insertionnelle demeurent des sources de préoccupation importantes (Lee & Kumar, 2009; Raemdonck, et al., 2008).

1.3.3.4 Les défis et les entraves des siARN

L'utilisation de siARN synthétiques agissant principalement dans le cytoplasme est favorisée par rapport aux vecteurs menant à la transcription de shARN ou de siARN (Raemdonck, et al., 2008; Takahashi, et al., 2009). Néanmoins, la livraison de siARN synthétiques aux cellules contenant la séquence d'ARNm cible demeure le plus grand obstacle de la thérapie génique par ARNi (Aagaard & Rossi, 2007; Dykxhoorn & Lieberman, 2006; Lee, Mok, et al., 2011; Novina & Sharp, 2004). Cet obstacle est dû à la multitude de barrières biologiques que doivent surmonter les siARN avant d'atteindre la machinerie d'ARNi dans le cytoplasme. Il existe plusieurs moyens de favoriser le transport des siARN tels que leur modification chimique, la conjugaison de molécules et l'utilisation de système de livraison.

1.3.4 Les facteurs influençant l'efficacité du silençage génique

1.3.4.1 Le choix des séquences de siARN

En premier lieu, une sélection réfléchie des séquences de siARN doit être faite avant la livraison afin de minimiser les effets non-spécifiques. Une séquence de siARN peut cibler plus d'une séquence d'ARNm, car il a été démontré qu'il est possible d'obtenir un bon taux de silençage malgré un défaut d'appariement d'un seul nucléotide entre le brin guide d'un siARN et les ARNm (Leung & Whittaker, 2005). Par conséquent, il se peut que des siARN synthétiques ciblant une certaine séquence d'ARNm inhibent l'expression génique de protéines non ciblées et/ou essentielles à la survie cellulaire (Leung & Whittaker, 2005). Similairement aux miARN, la complémentarité partielle entre la région clé du brin guide des siARN (nucléotides 2-7 à partir de l'extrémité 5') et la région 3'UTR des ARNm mène à l'inhibition génique de plusieurs séquences d'ARNm différentes (Aagaard & Rossi, 2007; de Fougérolles, et al., 2007; Dorsett & Tuschl, 2004; Dykxhoorn, et al., 2003; Juliano, Alam, Dixit, & Kang, 2008; Kim & Rossi, 2007). De plus, les séquences immunogènes riches en guanines-uraciles sont reconnues par les TLR7 (Aagaard & Rossi, 2007; Dykxhoorn & Lieberman, 2006; Kim & Rossi, 2007; Lee, Mok, et al., 2011; Raemdonck, et al., 2008) ce qui induit l'action des IFN- α , IL-6 et TNF- α causant l'inhibition génique non-spécifique (Akhtar & Benter, 2007b; Leung & Whittaker, 2005). Il est important de ne pas confondre les effets non-spécifiques dus aux siARN et ceux engendrés par les systèmes de livraison de siARN, car certains peuvent causer l'inhibition génique non-spécifique et la toxicité (Akhtar & Benter, 2007b; Juliano, et al., 2008).

1.3.4.2 Les voies d'administration

Les siARN synthétiques peuvent être administrés entre autres par injection intracérébrale, sous-cutanée, intramusculaire, intrapéritonéale, intravitréenne ou intraveineuse (Leung & Whittaker, 2005). La méthode d'administration la plus propice à l'utilisation clinique demeure l'injection intraveineuse vu la possibilité d'atteindre une multitude de tissus par l'entremise du système sanguin, contrairement aux autres voies d'administration (Chu, et al., 2007; Dykxhoorn, et al., 2006). Il est donc possible d'administrer des siARN dans des organes tels que le foie, le cœur ou l'intestin sans avoir recours à une injection très invasive directement au tissu ciblé. Cependant, la

circulation systémique des siARN jusqu'à l'organe de choix implique la rencontre de plusieurs barrières biologiques.

1.3.4.3 Les nucléases et la filtration rénale des siARN

Le premier obstacle rencontré suite à l'administration par voie intraveineuse des siARN est l'activité des nucléases, exonucléases 3', du plasma et des tissus (Aigner, 2007; Juliano, et al., 2008; Juliano, et al., 2009; Shiri & Dan, 2010). L'activité des ARNase diminue grandement le temps de circulation des siARN, diminuant les chances d'accumulation dans les tissus ciblés. La courte demi-vie des siARN nus est aussi due à la filtration rénale rapide (Juliano, et al., 2009) pouvant facilement filtrer les siARN très hydrophiles et possédant une masse moléculaire se situant sous le seuil de filtration glomérulaire des reins (< 5 kDa) (Juliano, et al., 2008; Shiri & Dan, 2010).

1.3.4.3.1 Modifications chimiques et conjugaison

La modification chimique des siARN et la conjugaison de molécules de faibles masses moléculaires peuvent remédier à la courte demi-vie des siARN nus (Akhtar & Benter, 2007b; Dykxhoorn & Lieberman, 2006; Kim & Rossi, 2007; Lee, Mok, et al., 2011; Raemdonck, et al., 2008). Le remplacement de liens phosphodiesters par des liens phosphorothioates est un exemple de modification chimique sur le squelette des siARN. De plus, des résidus 2'-O-méthyle (2'OMe) peuvent être liés aux siARN dans le but de fournir une protection supplémentaire contre les nucléases. Il est très commun d'utiliser des résidus 2'OMe sur des siARN formés de liens phosphorothioates (Aagaard & Rossi, 2007; de Fougerolles, et al., 2007; Juliano, et al., 2008; Juliano, et al., 2009; Kim & Rossi, 2007; Leung & Whittaker, 2005). Des protéines en circulation peuvent se lier aux modifications chimiques des siARN augmentant la masse moléculaire des siARN, évitant ainsi leur filtration et améliorant leur biodistribution (Juliano, et al., 2009). Des conjugués peuvent aussi contribuer à la livraison de siARN à des cellules spécifiques en tirant profit des différentes protéines de reconnaissance présentes sur les membranes cellulaires (de Fougerolles, et al., 2007; Juliano, et al., 2008). Par exemple, en couplant les siARN à une molécule de cholestérol, les siARN peuvent incorporer sélectivement des lipoprotéines telles que les LDL ou les HDL. Ce faisant, les siARN évitent donc la clairance rénale et sont incorporés facilement dans les cellules hépatiques par l'entremise du contact entre les LDL et les HDL avec

les LDLr ou SR-BI, respectivement (Soutschek, et al., 2004; Wolfrum, et al., 2007). Une autre manière de limiter la filtration rénale et la dégradation par nucléase est la condensation des siARN par des systèmes de livraison formant ainsi des nanoparticules (Aigner, 2007). Cependant, l'utilisation de nanoparticules est restreinte par la clairance via le système réticuloendothélial (RES : *reticuloendothelial system*).

1.3.4.4 La clairance via le RES

Le RES est composé de cellules phagocytaires ayant pour fonction d'éliminer les pathogènes étrangers, les débris cellulaires générés suite à des changements tissulaires, les cellules ayant subi l'apoptose et même des siARN (Juliano, et al., 2008; Juliano, et al., 2009; Shiri & Dan, 2010). Les cellules phagocytaires du RES correspondent à des monocytes en circulation et des macrophages tissulaires (cellules de Kupffer) très abondants dans le foie et la rate, des organes possédant une vascularisation très abondante et fenêtrée (Juliano, et al., 2008; Juliano, et al., 2009; Shiri & Dan, 2010). Il va de soi que le foie est un site important d'accumulation de siARN, ce qui est avantageux si le traitement par ARNi cible des cellules hépatiques (Akhtar & Benter, 2007b). Le foie est un organe très facile à cibler étant donné sa grande vascularisation, son rôle de filtreur de sang et de détoxifiant (Dykxhoorn, et al., 2006). Les nanoparticules contenant des siARN sont constamment sujettes à la dégradation dans les lysosomes des macrophages du RES. Si les nanoparticules résistent à la dégradation, la conservation des siARN dans le RES durant une période de temps prolongée peut induire la toxicité. Cette toxicité conduit à l'élévation du niveau de transaminases dans le foie ou la dégénérescence tubulaire des reins (Juliano, et al., 2009). Afin d'éviter l'absorption par le RES, des molécules de polyéthylène glycol (PEG) peuvent être conjuguées aux nanoparticules afin d'empêcher l'adsorption d'opsonines nécessaires à la phagocytose par les macrophages (Juliano, et al., 2008; Juliano, et al., 2009).

1.3.4.5 La barrière endothéliale et la matrice extracellulaire

Si les nanoparticules réussissent à éviter la clairance via le RES, celles-ci doivent être en mesure de passer à travers la barrière endothéliale du système sanguin et de circuler à travers la matrice extracellulaire (Juliano, et al., 2008; Juliano, et al., 2009; Shiri & Dan, 2010). En effet, le foie et la rate possèdent une vascularisation fenêtrée, correspondant à des petits espacements entre les CE artérielles (Juliano, et al., 2008; Juliano, et al., 2009). Par conséquent, les nanoparticules

doivent avoir une taille inférieure à 100 nm, dans le but d'atteindre efficacement leurs cellules cibles et y pénétrer (Akhtar & Benter, 2007b; Juliano, et al., 2008; Juliano, et al., 2009; Shiri & Dan, 2010; Xu & Anchordoquy, 2011).

1.3.4.6 Les barrières biologiques cellulaires

Lorsque les nanoparticules atteignent finalement les cellules cibles, elles doivent franchir la membrane cellulaire afin d'atteindre la machinerie d'ARNi (de Fougerolles, et al., 2007; Juliano, et al., 2008). Étant donné la taille, la polarité et parfois la charge des nanoparticules, la pénétration dans le milieu cellulaire se fait par endocytose (Juliano, et al., 2008; Juliano, et al., 2009). Premièrement, il y a interaction entre les nanoparticules et la membrane cellulaire ce qui facilite l'endocytose. L'interaction peut se faire par différents mécanismes, tels que par liaison ligand-récepteur ou par interaction électrostatique. Il est possible de favoriser l'absorption cellulaire en tirant profit des récepteurs cellulaires spécifiques au système de livraison, tels que les LDLr des cellules hépatiques spécifiques aux LDL pouvant transporter des siARN (Soutschek, et al., 2004; Wolfrum, et al., 2007). La conjugaison d'acide hyaluronique (HA) aux nanoparticules permet aussi d'atteindre les cellules hépatiques efficacement (Lee, Park, et al., 2011; Park, et al., 2011). Après l'internalisation cellulaire, les nanoparticules se retrouvent dans des vésicules intracellulaires de faible pH, les endosomes et les lysosomes (endolysosomes) (Juliano, et al., 2009). Les nanoparticules doivent être libérées des endolysosomes, car cette séquestration représente un obstacle important dans l'efficacité du silençage génique (de Fougerolles, et al., 2007; Juliano, et al., 2008; Juliano, et al., 2009; Raemdonck, et al., 2008). Toutefois, des conjugués ont été développés afin de réagir aux conditions biologiques présentes dans les endolysosomes en permettant le largage des acides nucléiques (Cho, Kim, & Park, 2003; Juliano, et al., 2009; Medina-Kauwe, Xie, & Hamm-Alvarez, 2005). Par exemple, Rozema *et al.* ont mis au point une méthode dépendant de l'activation sélective d'un agent endosomolytique latent conjugué à leurs nanoparticules, agissant dans le milieu acide des endosomes (Rozema, et al., 2007). Après la libération des endolysosomes, les siARN intacts doivent être relâchés par le système de livraison afin que les siARN puissent entrer en contact avec la machinerie d'ARNi.

Les systèmes de livraison de siARN jouent un rôle essentiel dans le silençage génique. Certains promeuvent une efficacité d'inhibition génique plus élevée et d'autres une livraison plus

sécuritaire. Par conséquent, l'utilisation de l'ARNi à des fins thérapeutique dépend d'un système de livraison qui doit être efficace et sécuritaire.

1.4 Les systèmes de livraison des siARN

Un système de livraison efficace doit passer à travers les multiples barrières biologiques faisant obstacle à la livraison de siARN. La modification chimique des siARN et la conjugaison de molécules aux siARN peuvent contribuer à l'efficacité de livraison. Toutefois, les nanoparticules correspondent à l'option idéale, puisqu'elles peuvent, jusqu'à un certain degré, protéger les siARN des nucléases du système sanguin, permettre de contourner le RES, éventuellement atteindre les cellules et franchir leur membrane cellulaire (Akhtar & Benter, 2007b). Les nanoparticules permettent à une très grande quantité de siARN d'être livrée à travers les multiples barrières biologiques, étant donné que les nanoparticules peuvent contenir des centaines ou des milliers de copies de siARN (Juliano, et al., 2008). Il existe plusieurs systèmes de livraison tels que les lipoplexes et les polyplexes cationiques et non-cationiques (de Fougerolles, et al., 2007; Juliano, et al., 2008; Shiri & Dan, 2010). Les systèmes de livraison cationiques, à base de lipides ou de polymères, permettent la liaison avec les siARN chargés négativement et facilitent l'interaction avec les membranes cellulaires (Akhtar & Benter, 2007b; Shiri & Dan, 2010). Certains systèmes de livraison peuvent s'auto-assembler par des interactions électrostatiques entre les polycations et les siARN, permettant ainsi de former des nanoparticules (Howard & Kjems, 2007). Cependant, les systèmes de livraison cationiques peuvent produire des changements au niveau de l'expression de certains gènes, influençant ainsi l'efficacité et la spécificité des siARN (Akhtar & Benter, 2007b). Des études de toxicogénomique peuvent être réalisées afin de prédire les effets non-spécifiques causés par un système de livraison (Akhtar & Benter, 2007a). De plus, l'adsorption d'opsonines sur les nanoparticules cationiques favorise leur absorption dans les cellules immunitaires du RES, d'où la conjugaison de chaîne de PEG dans le but d'éviter la reconnaissance par les cellules immunitaires (Dobrovolskaia, Aggarwal, Hall, & McNeil, 2008).

1.4.1 Les nanoparticules lipidiques

Les lipoplexes cationiques composés de lipides (tels que l'OligofectamineTM et la LipofectamineTM) et de siARN sont utilisés dans plusieurs travaux de recherche pour la

transfection *in vitro* (Akhtar & Benter, 2007b). Zimmermann *et al.* ont démontré la grande efficacité des nanoparticules lipides/acides nucléiques stables (SNALP : *stable nucleic acid-lipid particles*) à livrer systématiquement des siARN spécifiques à la séquence d'ARNm codant pour l'ApoB dans le foie de modèles murin et primate non-humain (Zimmermann, et al., 2006). Par contre, les SNALP utilisent la livraison passive. En effet, l'absence d'un conjugué de ciblage cellulaire restreint l'utilisation des SNALP aux organes compris dans le RES tels que le foie ou la rate. La livraison passive favorise l'accumulation des nanoparticules dans les tumeurs ou les sites d'inflammation en tirant profit de l'effet de perméabilité et de rétention (EPR : *enhanced permeability and retention*) (Akhtar & Benter, 2007b; Shiri & Dan, 2010). Malgré la grande efficacité des lipoplexes cationiques, ceux-ci sont considérés comme étant toxiques, ralentissant leur utilisation en milieu clinique. Certaines formulations de lipides causent l'expression de gènes non-spécifiques et amplifient la réponse immunitaire contre les siARN (Akhtar & Benter, 2007b).

1.4.2 Les nanoparticules polymériques

Le polyéthylèneimine (PEI), les dendrimères, l'atelocollagène et le chitosane sont des polymères utilisés fréquemment comme système de livraison (Aigner, 2007; Akhtar & Benter, 2007b; de Fougerolles, et al., 2007). Tout comme pour les nanoparticules lipidiques, il est possible de greffer des molécules sur les nanoparticules polymériques de manière à augmenter leur stabilité stérique (PEG) ou leur spécificité (anticorps, transferrine) (de Fougerolles, et al., 2007; Juliano, et al., 2008; Shiri & Dan, 2010). Le PEI est de loin le polymère le plus étudié dans le domaine de la livraison d'acides nucléiques (de Fougerolles, et al., 2007). Toutefois, dépendamment de la masse moléculaire et de l'architecture du PEI, celui-ci cause de la toxicité cellulaire et des effets non-spécifiques (Akhtar & Benter, 2007b). Vu la polyvalence chimique des polymères, il est possible d'optimiser les polymères afin d'éviter tous les effets secondaires possibles. Par exemple, Rozema *et al.* ont développé un système de livraison polymérique, poly(éther de vinyle) amphiphiles (polyconjugués dynamiques), pouvant se libérer des endosomes. Ce système de livraison est stabilisé en utilisant la conjugaison au PEG et il peut aussi cibler spécifiquement les cellules hépatiques par l'entremise du ligand N-acétylglucosamine (NAG). Les propriétés des polyconjugués dynamiques ont permis l'inhibition génique efficace de l'ARNm ApoB dans un modèle murin en évitant toute toxicité (Rozema, et al., 2007).

1.4.2.1 La libération endolysosomale

Hypothétiquement, la libération endolysosomale des polyplexes repose sur l'effet d'éponge à protons survenant grâce au pouvoir tampon des polymères cationiques. L'effet d'éponge à protons survient lors de l'acidification des endolysosomes contenant les nanoparticules polymériques chargées positivement. L'abaissement du pH endolysosomal va induire un influx important d'ions H^+ dans l'endolysosome par l'entremise de pompes à proton en utilisant l'énergie libérée par l'hydrolyse d'une molécule d'adénosine-5'-triphosphate (ATP). Cette accumulation d'ions H^+ mène aussi à l'influx d'ions Cl^- , créant un gonflement osmotique dans l'endolysosome. Ce gonflement crée une pression osmotique sur la paroi endolysosomal et déstabilise les endolysosomes, permettant donc de libérer les nanoparticules polymériques dans le cytoplasme cellulaire (Sonawane, Szoka, & Verkman, 2003; Yang & May, 2008).

1.4.2.2 Les essais cliniques

Jusqu'à ce jour, il y a eu 363 essais cliniques en thérapie génique, en cours ou complétés (www.clinicaltrials.gov). Par exemple, l'Allovectin-7®, un complexe lipidique contenant une séquence d'ADN codant pour HLA-B7 et $\beta 2$ microglobuline (Bedikian & Del Vecchio, 2008), est présentement utilisé dans une étude clinique de phase 3 ayant pour but de traiter des mélanomes de stade 3 et 4 (Vical, 2011). Plusieurs des études cliniques utilisent des vecteurs viraux qui constituent des systèmes de livraison efficaces, mais pouvant être accompagnés d'effets indésirables dangereux. (Xu & Anchordoquy, 2011). Depuis 2005, 14 études cliniques basées sur la thérapie par siARN ont débuté dont trois d'entre elles ont complété la phase I sans toxicité. Ces trois études ont visé la dégénérescence maculaire liée à l'âge (AMD : *age-related macular degeneration*) et le virus respiratoire humain syncytial (RSV : *respiratory syncytial virus*) par la livraison de siARN seuls non-modifiés (AMD; Cand5 et RSV; ALN-RSV01) et modifiées (AMD; SIRNA-027) par injection intravitréenne directe et par aérosol, respectivement (Aigner, 2007; Akhtar & Benter, 2007b; de Fougerolles, et al., 2007; Dykxhoorn, et al., 2006; Kim & Rossi, 2007; Leung & Whittaker, 2005; Xu & Anchordoquy, 2011). L'ARNi thérapeutique offre la possibilité de cibler des maladies non traitables par médicaments. Ainsi, l'engouement entourant l'ARNi thérapeutique a engendré une quantité impressionnante d'études (Aagaard & Rossi, 2007; Aigner, 2007; Dorsett & Tuschl, 2004; Kim & Rossi, 2007; Leung & Whittaker, 2005; Thomas, et al., 2004). Il existe présentement une multitude d'études *in vivo*

ciblant des sources de maladies importantes. Par exemple, le ciblage de l'ApoB est hautement prometteur étant donné l'implication de cette protéine dans l'initiation de l'athérosclérose.

1.4.3 Le silençage génique de l'ApoB par l'utilisation de l'ARNi

Depuis 2004, plusieurs systèmes de livraison ont été utilisés dans le but de livrer des siARN ciblant le gène codant pour l'ApoB. Soutschek *et al.* ont réussi à atteindre *in vivo*, dans un modèle murin, un niveau de silençage génique de l'ApoB de 57 % par la livraison intraveineuse de siARN-ApoB modifiés chimiquement et conjugués à une molécule de cholestérol. Malgré l'utilisation d'une dose élevée de 50 mg de siARN-ApoB/kg (Soutschek, et al., 2004) non-transférable à l'humain, l'étude pionnière de Soutschek *et al.* a mis le ciblage de l'ApoB sous les projecteurs. En utilisant un conjugué de cholestérol et les mêmes conditions expérimentales que Soutschek *et al.*, Wolfrum *et al.* ont réussi à atteindre un niveau de silençage génique de l'ApoB de 75 %, menant à une réduction de l'ApoB en circulation de 50 % (Wolfrum, et al., 2007). Ensuite, des chercheurs ont injecté des SNALP par voie intraveineuse et ont réussi à atteindre des niveaux de silençage génique *in vivo* de l'ApoB élevés dans un modèle murin, environ 80 % (Judge, et al., 2006), et dans un modèle primate non-humain, environ 80 % (Zimmermann, et al., 2006). L'étude de Zimmermann *et al.* est toujours considérée comme une référence vu l'obtention de taux élevés de silençage génique en utilisant des doses de siARN-ApoB vingt fois inférieures à celles utilisées par Soutschek *et al.* (Soutschek, et al., 2004; Zimmermann, et al., 2006). Par conséquent, plusieurs chercheurs ont évalué différents systèmes de livraison dans le but de surpasser les résultats atteints par Zimmerman *et al.* avec les SNALP. En effet, les siARN-ApoB ont été livrés efficacement par différentes nanoparticules : des nanoparticules interférentes (iNOP-7) (Baigude, et al., 2007), des polyconjugués dynamiques (Rozema, et al., 2007), des α -tocophérols (Nishina, et al., 2008), des lipidoïdes (Akinc, et al., 2008), des nanotubes à parois simples (McCarroll, Baigude, Yang, & Rana, 2009), des poly-L-lysine dendritiques (Watanabe, et al., 2009), des nanoparticules d'acide hyaluronique/PEI (Park, et al., 2011), des liposomes¹

¹ Administration de liposomes dans des souris LDLr^{+/-} CETP^{+/-} ayant une seule copie du transgène humain de la protéine de transfert de cholestérol estérifié (CETP : *cholesteryl ester transfert protein*) et une seule copie d'une mutation des LDLr.

(Ason, et al., 2011; Tadin-Strapps, et al., 2011) et des nanoparticules d'orcystéamine/siARN/PEI/acide hyaluronique (Lee, Park, et al., 2011). Les différences entre les études ciblant l'ApoB par l'administration intraveineuse de siARN dans un modèle murin, résumées dans le Tableau 1.1, 1.2 et 1.3, correspondent principalement aux modèles murins utilisés, aux formes des siARN-ApoB, aux systèmes de livraison, aux dosages, aux administrations, aux analyses phénotypiques réalisées et aux études de réponses immunitaires et/ou les études de toxicologie. Des polymères ont été utilisés par Rozema *et al.*, ainsi que par Ghosn *et al.* (Ghosn, et al., 2010; Rozema, et al., 2007). Ghosn *et al.* ont utilisé du chitosane-imidazole-4-acide acétique (chitosane-IAA-PEG-SVA) couplé à une molécule de PEG-succinimidyl valérate (PEG-SVA) comme système de livraison (Ghosn, et al., 2010). Il existe un grand nombre de systèmes de livraison polymériques prometteurs avec ou sans modifications pouvant livrer systématiquement des siARN-ApoB jusqu'au foie, tel que le chitosane.

Tableau 1.1: Paramètres expérimentaux étudiés dans les publications abordant le silençage génique de l'ApoB par injection intraveineuse de siARN-ApoB dans un modèle murin.

Références	Modèle murin	Forme de siARN-ApoB	Système de livraison	Dosage	Administration	Analyse phénotypique	Réponse immunitaire/toxicologie
(Soutschek, et al., 2004)	C57BL/6 Diète normale	2'OMe et lien phosphorothioate	Chaînes de cholestérol greffées	50 mg/kg	1 injection/jour. 3 jours consécutifs	ApoB100, lipoprotéines, cholestérol de LDL et total	Aucune mention
(Judge, et al., 2006)	BALBc Diète normale	2'OMe	SNALP	5 mg/kg	1 injection/jour. 3 jours consécutifs	ApoB total, cholestérol total	BALBc : Perte de poids, IFN- α Souris CDI ICR : analyse de cytokines
(Zimmermann, et al., 2006)	C57BL/6 Diète normale	2'OMe et lien phosphorothioate	SNALP	2,5 mg/kg	1 injection	ApoB total, ApoB100	Aucune mention
(Baigude, et al., 2007)	C57BL/6 Diète normale	2'-O-fluoro et squelette sulfate d'héparane	iNOP-7	5 mg/kg	1 injection/jour. 3 jours consécutifs	Cholestérol total, ApoB48 et ApoB100	IFN- α
(Rozema, et al., 2007)	C57BL/6 Diète normale	2'OMe et lien phosphorothioate	Polyconjugués dynamiques	2-2,5 mg/kg	1 injection	Cholestérol total, ApoB100, contenu hépatique de lipides	TNF- α , IL-6, IFN- α et analyse d'hépatotoxicité
(Wolfrum, et al., 2007)	C57BL/6 Diète normale	2'OMe et lien phosphorothioate	Chaînes de cholestérol greffées	50 mg/kg	1 injection/jour. 3 jours consécutifs	ApoB total	Aucune mention
(Nishina, et al., 2008)	Aucune mention	2'OMe et lien phosphorothioate	α -tocophérol	2 mg/kg	1 injection	Triglycérides, cholestérol total, contenu hépatique de lipide	IFN- α et analyse hématologique et d'hépatotoxicité

Tableau 1.2: Paramètres expérimentaux étudiés dans les publications abordant le silençage génique de l'ApoB par injection intraveineuse de siARN-ApoB dans un modèle murin. (Suite)

Références	Modèle murin	Forme de siARN-ApoB	Système de livraison	Dosage	Administration	Analyse phénotypique	Réponse immunitaire/toxicologie
(Akinc, et al., 2008)	C57BL/6 Diète normale	2'OMe et lien phosphorothioate	Lipidoïdes	2, 3 et 5 mg/kg	1 injection	Aucune mention	Aucune mention
(McCarroll, et al., 2009)	C57BL/6 Diète normale	2'-O-fluoro et squelette sulfate d'héparane	Nanotubes à parois simples	0,96 mg/kg	1 injection	ApoB48, ApoB100, cholestérol total	IFN- α
(Watanabe, et al., 2009)	C57BL/6 et Souris ApoE ^{-/-}	siARN-ApoB non-modifiés	Poly-L-lysine dendritique	0,25, 1 et 2,5 mg/kg	1 injection	Souris ApoE ^{-/-} : cholestérol LDL/VLDL	Analyse d'hépatotoxicité (AST et ALT)
(Ghosn, et al., 2010)	BALB/C Diète normale	Silencer® Select ApoB siRNA (Ambion)	Chitosane (86-130-40)-IAA-PEG-SVA	1,5 mg/kg	1 injection/jour. 2 jours consécutifs	Aucune mention	Aucune mention
(Park, et al., 2011)	BALB/C Diète normale	2'-déoxy	nanoparticules d'acide hyaluronique et PEI	30 µg/tête	1 injection	Aucune mention	Aucune mention
(Tadin-Strapps, et al., 2011)	Souris hémizygotes LDLr ^{+/-} CETP ^{+/-}	2'-déoxy, 2'-O-fluoro, 2'OMe, nucléotides abasiques inversés aux extrémités 5' et 3'	Liposomes	3 mg/kg	1 injection	Cholestérol total, HDL, non-HDL, triglycérides, ApoB, ApoA, contenu hépatique de lipides	Analyse d'hépatotoxicité

Tableau 1.3: Paramètres expérimentaux étudiés dans les publications abordant le silençage génique de l'ApoB par injection intraveineuse de siARN-ApoB dans un modèle murin. (Suite)

Références	Modèle murin	Forme de siARN-ApoB	Système de livraison	Dosage	Administration	Analyse phénotypique	Réponse immunitaire/toxicologie
(Lee, Park, et al., 2011)	BALB/C	2'-déoxy	Nanoparticule d'or/cystéamine/siARN/PEI/HA	0,45, 0,9 et 1,8 nmol siARN/souris	1 injection	Aucune mention	Aucune mention
(Ason, et al., 2011)	Souris hémizygotes LDLr ^{+/-} CETP ^{+/-}	2'-déoxy, 2'-O-fluoro, 2'OMe, nucléotides abasiques inversés aux extrémités 5' et 3'	Liposomes	3 mg/kg	1 injection aux jours 0 et 14	ApoB, cholestérol total, HDL, non-HDL, triglycérides, contenu hépatique de lipides	Aucune mention

1.5 Le chitosane

Le chitosane est un polymère cationique amplement étudié à travers le monde et il est utilisé dans plusieurs axes de recherche. Le chitosane est impliqué dans de nombreuses applications telles que les médicaments, l'ingénierie tissulaire et la livraison de macromolécules (Issa, Köping-Höggård, & Artursson, 2005). En effet, le chitosane est utilisé comme système de livraison de plasmides et de siARN (Howard, et al., 2008). L'utilisation de nanoparticules chitosane/ADN plasmidique (ADNp) a été étudiée de manière extensive d'un point de vue technique, ainsi que thérapeutique (Iqbal, et al., 2003). Comparativement, la recherche sur la livraison de siARN par le chitosane est beaucoup plus jeune, mais en forte croissance. De plus, le chitosane est étudié en ingénierie tissulaire, où une solution de chitosane gélifiante est utilisée comme échafaudage dans la réparation de cartilage articulaire (Hoemann, Sun, Légaré, McKee, & Buschmann, 2005). Étant donné sa polyvalence et ses nombreux avantages, le chitosane correspond à un outil biomédical possédant un grand potentiel thérapeutique.

1.5.1 La provenance et la synthèse du chitosane

Le chitosane est un polysaccharide linéaire composé d'unités N-acétyl-D-glucosamine (GlcNAc) et D-glucosamine (GlcN) distribuées aléatoirement et liées par des liens β -(1-4) glycosidiques (Issa, et al., 2005; Lai & Lin, 2009; Rudzinski & Aminabhavi, 2010). Le chitosane est un polymère naturel obtenu par la désacétylation alcaline partielle de la chitine, tel que présenté à la Figure 1-3. La chitine est un élément structurel de l'exosquelette des crustacés et d'insectes ainsi que des membranes cellulaires des champignons (Kean & Thanou, 2010; Lai & Lin, 2009; Mao, et al., 2010; Rudzinski & Aminabhavi, 2010; Saranya, Moorthi, Saravanan, Devi, & Selvamurugan, 2011).

Le chitosane est produit selon la méthode d'Onsoyen et Skaugrud (Onsoyen & Skaugrud, 1990). Premièrement, suite au broyage des carapaces de crustacés, le broyat est déprotéinisé. La déprotéinisation se fait par l'entremise d'une solution d'hydroxyde de sodium ou par un procédé enzymatique. Le broyat déprotéinisé est ensuite déminéralisé. Parallèlement, le carbonate de calcium est extrait par dissolution dans une solution d'acide chlorhydrique. La chitine brute est ultérieurement décolorée grâce à un agent oxydant (KMnO_4 , NaOCl ou H_2O_2). Le chitosane est

finaleme nt obtenu par la désacétylation de la chitine brute en milieu basique. Dans une atmosphère inerte et en présence d'un agent réducteur (NaBH_4), le procédé de désacétylation partielle de la chitine brute se fait dans une solution d'hydroxyde de sodium concentré, à une température de 110-115 °C, durant quelques heures. Le chitosane est séché pour ensuite être purifié par dissolution dans un solvant acide. La solution contenant le chitosane est filtrée, séchée et broyée. La détermination du degré de désacétylation (DD, [%]) peut être faite par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du proton (^1H RMN) plus simplement, plus rapidement et avec plus de précision que par d'autres méthodes telles que la titration et la spectroscopie infrarouge ou ultra-violette (Lavertu, et al., 2003).

Le chitosane est un polymère très accessible étant donné l'abondance naturelle de la chitine ainsi que sa production et sa caractérisation relativement simples. L'intérêt grandissant entourant le chitosane repose sur ses nombreux avantages comme sa biocompatibilité, sa biodégradabilité, sa faible immunogénicité, sa faible cytotoxicité, sa solubilité, ses caractéristiques physico-chimiques ajustables et la possibilité de le modifier (Duceppe & Tabrizian, 2010; Kean & Thanou, 2010; Mao, et al., 2010; Rudzinski & Aminabhavi, 2010; Saranya, et al., 2011; Wang, et al., 2011). Les qualités du chitosane sont particulièrement intéressantes pour la livraison de gènes. Par conséquent, le chitosane pourrait être une alternative sécuritaire aux vecteurs viraux et non-viraux à base de lipides (Mao, et al., 2010). Le chitosane a été utilisé dans nos laboratoires comme système de livraison d'ADNp (Jean, Alameh, Buschmann, & Merzouki, 2011a; Jean, Alameh, De Jesus, et al., 2011; Jean, et al., 2009; Lavertu, Méthot, Tran-Khanh, & Buschmann, 2006; Nimesh, Thibault, Lavertu, & Buschmann, 2010; Thibault, et al., 2011; Thibault, Nimesh, Lavertu, & Buschmann, 2010) et de siARN (Alameh, Jean, Dejesus, Buschmann, & Merzouki, 2010; Jean, Alameh, De Jesus, et al., 2011).

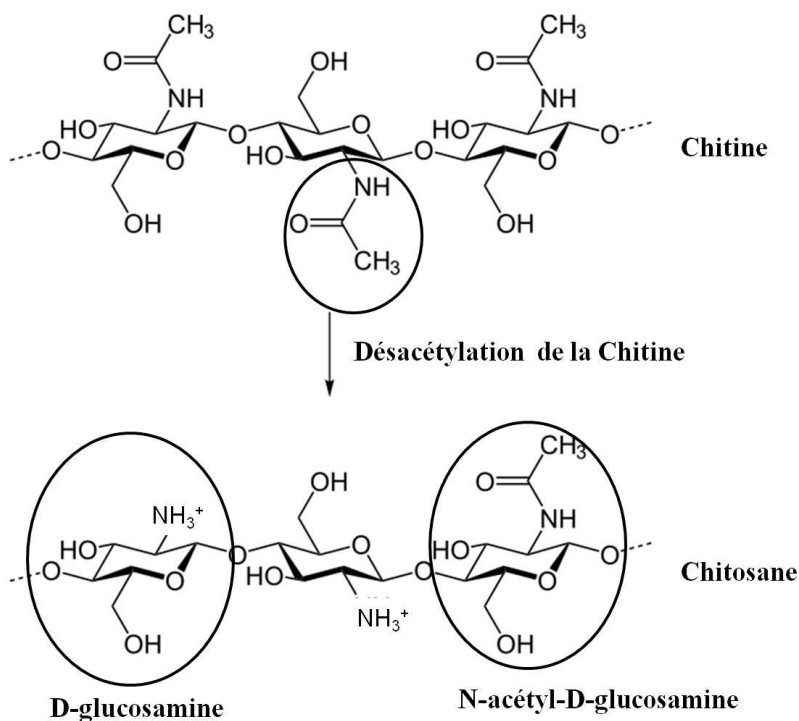


Figure 1-3 : Désacétylation de la chitine produisant le chitosane. Modifié de (NEUROtiker, 2008)

1.5.2 Les propriétés physico-chimiques du chitosane

Le DD et la masse moléculaire (MM, [kDa]) du chitosane sont des propriétés physico-chimiques ajustables influençant grandement l'efficacité de livraison d'acides nucléiques (Lavertu, et al., 2006). De plus, la formation des nanoparticules dépend du ratio de charge chitosane/acides nucléiques (amine:phosphate, N:P) et devrait être considéré conjointement au DD et à la MM (Mao, et al., 2010; Rudzinski & Aminabhavi, 2010; Saranya, et al., 2011). La formulation de chitosane (DD-MM-N:P) correspond à la nomenclature choisie pour spécifier quelles propriétés physico-chimiques du chitosane (DD et MM) ont été utilisées pour former les nanoparticules suivant un ratio N:P spécifiques.

1.5.3 L'influence du degré de désacétylation

Le DD du chitosane correspond au nombre de groupements amines désacétylés et est ainsi associé à la fraction d'unités ionisables du polymère cationique (Rudzinski & Aminabhavi, 2010). Sachant que les GlcN possèdent un pK_a d'environ 6,5, ceux-ci se chargent positivement à pH acide et perdent leur charge positive à pH neutre et basique (Mao, et al., 2010; Rudzinski &

Aminabhavi, 2010). Le chitosane est donc soluble en milieu acide et il perd sa solubilité lorsque le pH du milieu augmente. La nature cationique du chitosane lui fournit la capacité de se lier à des acides nucléiques chargés négativement de manière à les condenser et former des nanoparticules (Mao, et al., 2010). Les nanoparticules formées de chitosane ayant un DD élevé peuvent posséder une densité de charge surfacique (potentiel ζ) élevée. Les polyplexes à base de chitosane ayant un potentiel ζ élevé ont une plus grande facilité de liaison avec les membranes cellulaires négatives. Par conséquent, plus de nanoparticules se lient aux cellules cibles, favorisant donc le niveau de transfection cellulaire (Dehousse, et al., 2010; Howard, et al., 2006; Thibault, et al., 2010). Or, les nanoparticules ayant une densité de charge surfacique trop élevée peuvent induire plus de toxicité (Kean & Thanou, 2010). En revanche, l'utilisation de chitosane ayant une DD trop faible empêche la formation de nanoparticules stables, ce qui défavorise la livraison des acides nucléiques, diminuant donc l'expression du transgène ou le silençage génique (Kiang, Wen, Lim, & Leong, 2004; Liu, et al., 2007). Il est important de considérer les différents effets du DD du chitosane au niveau d'un modèle *in vitro* et d'un modèle *in vivo*. En effet, Kiang *et al.* ont rapporté qu'un DD élevé diminue l'expression génique *in vitro* et un DD faible mène à des taux d'expression génique *in vivo* élevés (Kiang, et al., 2004). L'influence du DD du chitosane sur l'efficacité de livraison des ADNp ou des siARN est similaire, malgré la grande différence entre ces acides nucléiques.

1.5.4 L'équilibre entre le degré de désacétylation et la masse moléculaire

L'influence de la MM du chitosane sur l'efficacité de transfection des polyplexes a souvent été étudiée conjointement à l'influence du DD (Huang, Fong, Khor, & Lim, 2005; Lavertu, et al., 2006; Thibault, et al., 2010; Zhang & Neau, 2001). Les nanoparticules sont plus stables si le chitosane a un DD et une MM élevés, puisque les nanoparticules chitosane/acides nucléiques seront formées de très longues chaînes hautement désacétylées de chitosane. Les chaînes de chitosane peuvent alors fortement condenser les acides nucléiques ce qui leur fournit une très bonne protection. Par contre, un DD et une MM élevés peuvent rendre les nanoparticules trop stables diminuant significativement la libération d'acides nucléiques dans les cellules cibles (Mao, et al., 2010). Par conséquent, il est nécessaire de trouver un équilibre entre la stabilité des nanoparticules et leur capacité de décondensation par l'ajustement du DD et de la MM. Lavertu *et al.* ont déterminé que l'atteinte de cet équilibre repose sur l'utilisation de formulations de

chitosane ayant un DD élevé et une MM faible ou vice-versa, pour des nanoparticules livrant des ADNp (Lavertu, et al., 2006). Jean *et al.* ont su tirer profit de ce principe par l'utilisation de chitosane ayant un DD de 92 % et une MM de 10 kDa dans des thérapies géniques *in vivo* basées sur l'expression de facteurs de croissance et de peptides similaires au glucagon-1 (GLP-1 : *glucagon-like peptide - 1*) (Jean, Alameh, et al., 2011a; Jean, et al., 2009). La littérature démontre une ambiguïté lorsqu'il est question de l'influence de la MM sur le taux de transfection. En effet, certains chercheurs affirment que l'utilisation de chitosane ayant une MM faible offre une efficacité de livraison d'ADNp supérieure (Koping-Hoggard, et al., 2004; Lavertu, et al., 2006; Nimesh, et al., 2010; Strand, et al., 2010), tandis que d'autres chercheurs présentent des résultats contraires (Huang, Khor, & Lim, 2004; Kiang, et al., 2004; MacLaughlin, et al., 1998; Mao, et al., 2010). Par contre, les divergences entre les études peuvent provenir des différents paramètres expérimentaux employés (Duceppe & Tabrizian, 2010; Mao, et al., 2010).

Liu *et al.* ont démontré que l'atteinte d'un niveau de silençage génique élevé dépend de la livraison de siARN par des formulations de chitosane de DD de 80 % et de MM élevée (65-170 kDa). Les formulations identifiées par Liu *et al.* permettent la formation de nanoparticules chitosane/siARN stables, contrairement aux nanoparticules formées par des formulations de chitosane ayant une MM faible (10 kDa) en raison de leur faible stabilité et leur incapacité à condenser les siARN (Liu, et al., 2007). Cependant, Techaarpornkul *et al.* ont démontré le contraire en utilisant des formulations de chitosane détenant des MM de 20 ou 45 kDa et un DD de 85 % pour livrer des siARN (Techaarpornkul, et al., 2010). Les observations de Techaarpornkul *et al.* rejoignent ce qui a été démontré par Lavertu *et al.* pour les nanoparticules chitosane/ADNp (Lavertu, et al., 2006).

1.5.5 L'influence de la masse moléculaire et du ratio N:P

L'effet combiné de la MM et du ratio N:P diffère pour les nanoparticules formées de chitosane complexé d'ADNp ou de siARN. Rojanarata *et al.* ont déterminé que l'induction du silençage génique nécessite la livraison de siARN par l'entremise de nanoparticules composées de chitosane de MM élevé (20 et 45 kDa) à un ratio N:P élevé (ratio N:P de 80) (Rojanarata, Opanasopit, Techaarpornkul, Ngawhirunpat, & Ruktanonchai, 2008). Or, il a aussi été démontré que la transfection de nanoparticules chitosane/ADNp est plus élevée en utilisant des

formulations de chitosane de haute MM complexées à un faible ratio N:P, ou vice-versa (Weecharangsan, et al., 2008). La grande différence entre les longs et flexibles ADNp et les petits et rigides siARN pourrait être la cause des différentes observations faites pour des nanoparticules de chitosane/siARN et chitosane/ADNp. En fait, les longues chaînes de chitosane seraient en mesure de s'enchevêtrer les unes avec les autres afin de bien s'entrelacer avec l'ADNp fortement anionique, cependant la nature rigide et moins chargée des siARN ne leur permettraient pas de s'imbriquer d'une telle manière avec les chaînes de chitosane (Katas & Alpar, 2006). Strand *et al.* ont suggéré qu'un ratio N:P trop élevé peut nuire à l'endocytose des nanoparticules chitosane/ADNp à cause des liaisons surabondantes de chitosane libre sur les membranes cellulaires. L'accumulation de chitosane libre sur les membranes cellulaires mène à l'engorgement des voies d'endocytose, ce qui crée une compétition avec les polyplexes (Strand, et al., 2010). Toutefois, Thibault *et al.* ont démontré que l'excès de chitosane provenant d'un ratio N:P élevé favorise la libération endolysosomale des polyplexes (Thibault, et al., 2011). Parallèlement, Koping-Hoggard *et al.* ont suggéré que la libération endolysosomale des nanoparticules formées de chitosane ayant une MM élevée se fait principalement par l'augmentation de la pression osmotique due aux fragments de chitosane produits par la digestion enzymatique du polymère (Koping-Hoggard, et al., 2004). De plus, les nanoparticules formées de chitosane peuvent aussi être libérées des vésicules grâce à l'effet d'éponge à protons survenant grâce au pouvoir tampon du chitosane (Yang & May, 2008).

1.5.6 Les facteurs affectant l'efficacité de livraison et de transfection des nanoparticules chitosane/siARN

L'ajustement du DD, de la MM et du ratio N:P permet de contrôler les caractéristiques intrinsèques des nanoparticules chitosane/siARN. Plusieurs facteurs externes peuvent affecter l'efficacité du silençage génique entre autres le pH du milieu de transfection, les cellules cibles, la présence de sérum, la demi-vie de la protéine ciblée et la quantité d'ARNm ciblé (Dehousse, et al., 2010; Duceppe & Tabrizian, 2010; Mao, et al., 2010). De plus, similairement aux autres systèmes de livraison, les barrières biologiques telles que la clairance via le RES, la barrière endothéliale, la matrice extracellulaire et les barrières cellulaires affectent grandement l'efficacité des nanoparticules chitosane/siARN (Juliano, et al., 2008; Juliano, et al., 2009).

Afin de limiter l'effet des nombreux facteurs externes sur les nanoparticules chitosane/siARN, plusieurs modifications peuvent être apportées au chitosane. De plus, des conjugués peuvent être employés pour limiter l'influence de facteurs externes. Par exemple, la liaison de molécules de pyrophosphate de thiamine (ThPP : *thiamine pyrophosphate*) aux groupes amines du chitosane mène à la formation de sels favorisant la solubilité du chitosane. Les molécules de ThPP sont des vitamines solubles dans l'eau, ce qui les rend moins propices à l'induction de toxicité. Les groupes amines des molécules de ThPP conservent leur charge positive à pH physiologique ce qui favorise l'efficacité de transfection des nanoparticules chitosane-ThPP/siARN (Rojanarata, et al., 2008). La liaison de molécules de tripolyphosphate (TPP) au chitosane favorise la stabilité des nanoparticules dans un milieu ayant une concentration de sérum de 50 % en protégeant les siARN des nucléases pendant au moins sept heures (Katas & Alpar, 2006). La modification structurelle du chitosane comme la formation de chitosane triméthylé (TMC : *trimethylated chitosan*) a permis de conserver, avec une faible cytotoxicité, le silençage génique induit par les siARN malgré la présence de sérum (Varkouhi, et al., 2011). De plus, le chitosane-TMC est moins affecté par le pH que le chitosane non-modifié favorisant donc la stabilité des nanoparticules formées de chitosane-TMC (Mao, et al., 2010).

Le chitosane peut aussi être utilisé en tant que revêtement sur des nanoparticules d'acide poly(lactique-co-glycolique) (PLGA : *poly(lactic-co-glycolic acid)*) dans le but de favoriser l'absorption à travers les membranes muqueuses. Le chitosane est un revêtement très intéressant étant donné sa biocompatibilité et sa biodégradabilité (Tahara, Sakai, Yamamoto, Takeuchi, & Kawashima, 2008). Des systèmes de livraison hybrides formés de chitosane et de PEI permettent de combiner la biocompatibilité et la non-toxicité du chitosane avec l'efficacité de transfection du PEI (Jere, et al., 2009; Jiang, et al., 2008). La réticulation ionique ou covalente, la coacervation, la précipitation et l'auto-assemblage sont des méthodes de formation de nanoparticules pouvant aussi avoir un effet sur l'efficacité des polyplexes de chitosane (Lai & Lin, 2009; Wang, et al., 2011).

Puisque l'utilisation du chitosane comme système de livraison est en développement, peu d'études *in vivo* sur l'efficacité de livraison du chitosane ont vu le jour. Une étude évaluant l'efficacité de livraison du chitosane a démontré la capacité du chitosane-PEG à livrer de l'insuline par l'entremise des voies nasales (Zhang, et al., 2008). Howard et al. ont réussi à

induire le silençage génique de la protéine fluorescente verte améliorée (EGFP : *enhanced green fluorescent protein*) dans des souris transgéniques EGFP par l'administration nasale de nanoparticules chitosane/siARN non-modifiées (Howard, et al., 2006). De plus, le chitosane non-modifié a aussi servi à la livraison intrapéritonéale des siARN ciblant l'ARNm codant pour le TNF- α dans le but de traiter l'inflammation dans un modèle murin d'arthrite (Howard, et al., 2008).

L'administration intraveineuse demeure un très grand défi pour les nanoparticules chitosane/siARN cationiques non-modifiées d'où l'utilisation de différentes voies d'administration. Le défi entourant l'injection intraveineuse met en jeu de multiples barrières biologiques pouvant perturber la livraison des siARN aux cellules cibles. Pourtant, ce mode de livraison est privilégié en clinique vu la possibilité d'atteindre une multitude de tissus et de traiter un grand nombre de maladies (Chu, et al., 2007; Dykxhoorn, et al., 2006). Ainsi, l'injection intraveineuse de nanoparticules chitosane/siARN non-modifiées à faibles doses devrait être considérée dans le but d'étudier l'efficacité de ces polyplexes dans le cadre du silençage génique de l'ApoB.

CHAPITRE 2 HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS

L'ApoB est une cible idéale pour le traitement de l'athérosclérose étant donné son rôle essentiel dans la formation de lipoprotéines de faibles densités athérogènes (Olofsson & Boren, 2005). Il a été démontré que l'administration intraveineuse de siARN-ApoB complexés à différents systèmes de livraison tels que les SNALP (Judge, et al., 2006; Zimmermann, et al., 2006), les polyconjugués dynamiques (Rozema, et al., 2007) ou les liposomes (Ason, et al., 2011; Tadin-Strapps, et al., 2011), permet d'induire le silençage génique de l'ApoB. La livraison intraveineuse de siARN-ApoB a aussi été réalisée avec succès par le chitosane-IAA-PEG-SVA dans un modèle animal (Ghosn, et al., 2010). Toutefois, les effets thérapeutiques induits par les siARN-ApoB ont été très peu étudiés. De plus, malgré quelques succès de livraison de siARN par le chitosane dans des modèles *in vivo* (Howard, et al., 2008; Zhang, et al., 2008), très peu d'études ont su tirer profit des qualités du chitosane non-modifié pour la livraison intraveineuse de siARN.

2.1 Hypothèse de recherche

L'hypothèse de recherche à la base des expérimentations réalisées dans le cadre de ce projet s'énonce comme suit :

L'administration par voie intraveineuse des nanoparticules chitosane/siARN-ApoB est en mesure d'induire des effets thérapeutiques sécuritaires dans un modèle murin d'athérosclérose.

2.2 Objectifs

Afin de vérifier l'hypothèse, les objectifs suivants ont été fixés :

1. Concevoir des nanoparticules chitosane/ODNdb-ApoB et caractériser leurs propriétés physico-chimiques.
2. Déterminer, *in vitro*, l'efficacité de transfection cellulaire des nanoparticules chitosane/ODNdb-ApoB dans différentes lignées cellulaires (HepG2, HEK293 et RAW264.7) en évaluant :
 - a. Le pourcentage de transfection
 - b. L'internalisation des nanoparticules, la libération endolysosomale des nanoparticules et la libération des acides nucléiques

3. Déterminer, *in vitro*, la capacité des nanoparticules chitosane/siARN-ApoB d'inhiber l'expression de l'ARNm codant pour l'ApoB dans des cellules HepG2
4. Déterminer l'effet thérapeutique des nanoparticules chitosane/siARN-ApoB, administrées par voie intraveineuse dans un modèle murin d'athérosclérose, en évaluant :
 - a. Les variations de poids chez les souris
 - b. Le niveau d'ApoB en circulation
 - c. Le niveau de cholestérol LDL/VLDL en circulation
 - d. Les fonctions hépatiques – profil biochimique
 - e. L'accumulation de vacuoles de gras dans les tissus du foie
 - f. La présence de réponses immunitaires dans les tissus du foie

2.3 Organisation du projet de recherche

L'atteinte des objectifs repose sur une méthodologie précise regroupant une multitude d'expériences. Les étapes méthodologiques entreprises dans le cadre de ce projet de recherche dans le but d'atteindre les objectifs énumérés dans ce chapitre sont résumées dans la Figure 2-1.

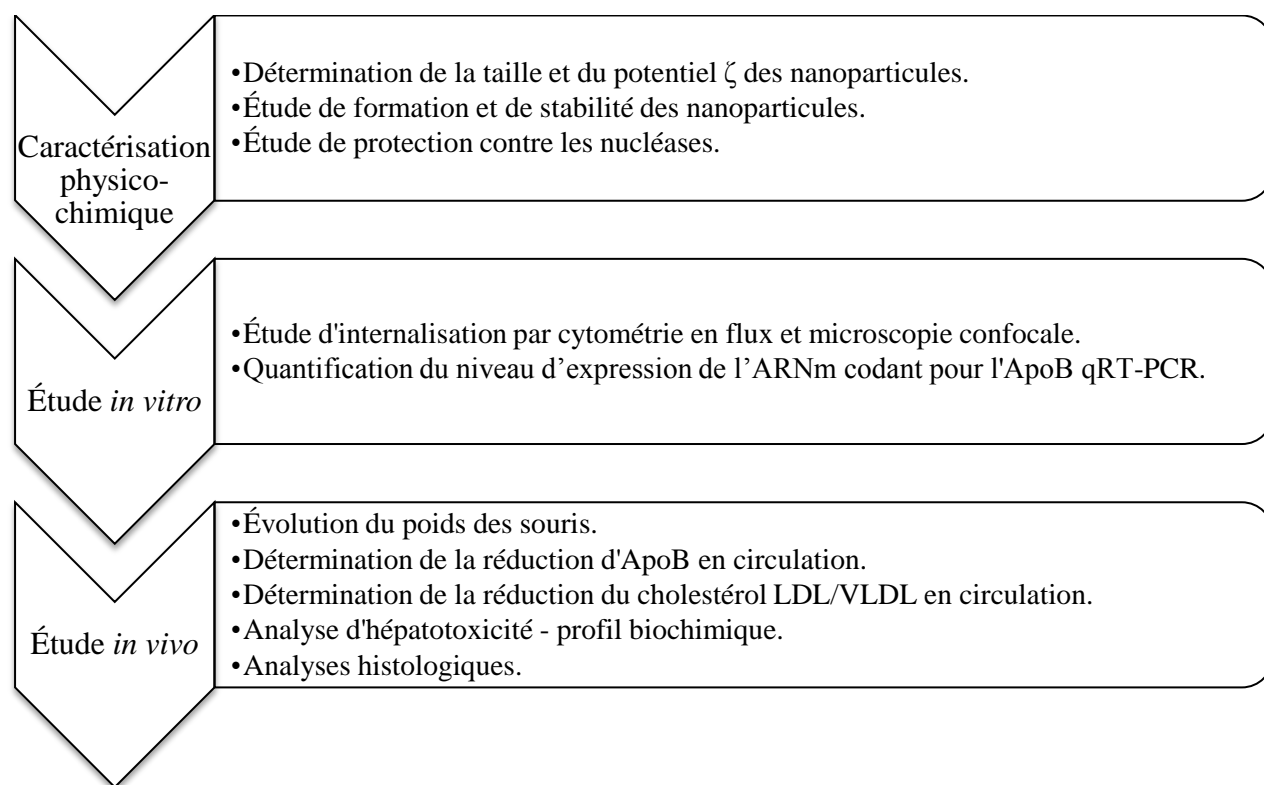


Figure 2-1: Organisation du projet de recherche

CHAPITRE 3 MÉTHODOLOGIE

3.1 Préparation des nanoparticules chitosane/acides nucléiques

3.1.1 Synthèse des ODNdb-ApoB et des siARN-ApoB

Les séquences des siARN-ApoB synthétisées ont été préalablement mises au point par Soutschek *et al.* (Soutschek, et al., 2004). Les chercheurs ont identifié des séquences pouvant cibler les ARNm codant pour l'ApoB murin et humain à l'aide de la bioinformatique. Les séquences de siARN-ApoB suivantes ont été synthétisées par synthèse chimique 2'-ACE ARN par la compagnie Dharmacon (Thermo Fisher Scientific, Dharmacon RNAi Technologies, Lafayette, CO., USA) : sens 5'GUCAUCACACUGAAUACCAAU3', antisens 5'AUUGGUAUUCAGUGUGAUGACAC3'. Des siARN leurres ayant la séquence 5'GUUUACAUGUCGACUAA3' (OnTARGET plus, Thermo Fisher Scientific, Dharmacon RNAi Technologies, Lafayette, CO., USA) ont été utilisés comme contrôle négatif de silençage génique puisqu'ils ne possèdent aucune spécificité pour une séquence d'ARNm. La caractérisation physico-chimique des nanoparticules formées de siARN-ApoB a été faite en utilisant des oligonucléotides double brin (ODNdb, 21 paires de bases, dépassement de 2 nucléotides) codant pour les mêmes séquences que les siARN-ApoB. Les duplex d'ODNdb-ApoB sont utilisés comme alternative, car ils sont plus faciles à manipuler et moins coûteux à produire comparativement aux siARN-ApoB synthétiques. Les seules différences entre les ODNdb et les siARN se trouvent dans la substitution de l'uracil (U) par une thymine (T) et dans le squelette désoxyribonucléique des ODNdb, comparativement au squelette ribonucléique des siARN. Malgré ces différences, la densité de charge entre les ODNdb et les siARN est la même vu le nombre identique de résidus phosphates présents sur leur squelette. La similarité structurelle entre les ODNdb et les siARN permettrait aux ODNdb-ApoB d'imiter les siARN-ApoB, interagissant de manière identique avec le chitosane. Les séquences d'ODNdb-ApoB ont été synthétisées par chimie des phosphoramidite par la compagnie IDT (Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, Iowa). Des ODNdb-ApoB marqués au 5' 6-carboxyfluorescéine (5' 6-FAM : 6-carboxyfluorescein) (IDT, Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, Iowa) ont été utilisés pour l'analyse par cytométrie en flux et la microscopie confocale. Le marqueur 6-

FAM possède une excitation et une émission maximales à des longueurs d'onde de 492 nm et 518 nm, respectivement.

3.1.2 Préparation des formulations de chitosane

Les échantillons de chitosane ultra pur (Ultrasan™) ont été fournis par la compagnie Biosyntech Inc. (Laval Qc., Canada). Les échantillons ont été soumis à un contrôle de qualité et leur purification a été assurée par des procédés qui ont permis d'éliminer les contaminants de protéines, d'endotoxines bactériennes et de métaux toxiques. Les échantillons de chitosane ont été dépolymérisés et caractérisés tel que décrit par Lavertu *et al.* (Lavertu, et al., 2006). Les échantillons de chitosane de différents DD (80 et 92 %) ont été dépolymérisés en utilisant l'acide nitreux afin d'obtenir des MM de 10 et 80 kDa. Plus spécifiquement, la masse moléculaire moyenne en nombre (Mn) et la masse moléculaire moyenne en poids (Mm) des chitosanes a été déterminée par chromatographie par perméation sur gel (GPC : gel permeation chromatography). Ainsi, l'indice de polydispersité (PDI : *polydispersity index*) des chitosanes a été déterminé en utilisant le rapport Mm/Mn. Le PDI est une mesure de la distribution des masses moléculaires des macromolécules présentes dans un échantillon de polymère. Par conséquent, le PDI donne une idée de l'homogénéité de la population de chitosane. Les échantillons de chitosane ont été dissous pendant 12 à 16 heures dans 50 mM d'acide hydrochlorique à 0,5 % (masse/volume) par agitation magnétique. Après la dissolution complète, les échantillons de chitosane ont été traités par des quantités spécifiques (0,001-0,1 mole/mole glucosamine) de nitrite de sodium pendant 16 heures à température de la pièce. La réaction a cessé par précipitation en utilisant du NaOH (6 N). Les précipités de chitosane ont été lavés par des centrifugations consécutives (4000 ×g, deux minutes) et dissous dans l'eau désionisée jusqu'à l'obtention d'un surnageant à pH neutre. Préalablement lyophilisés, les échantillons de chitosane ont été caractérisés par 1H RMN (Lavertu, et al., 2003).

Trois chitosanes ont été produites pour préparer les nanoparticules chitosane/ODNdb-ApoB et chitosane/siARN-ApoB. La variation entre les différentes formulations de chitosane se trouve au niveau du DD, de la Mn ou de la MM et du PDI, tel que présenté dans le Tableau 3.1. La dépolymérisation a permis d'obtenir des Mn très proches des MM ciblées (10 et 80 kDa). Toutefois, cette différence peut être considérée comme étant nominale. Les trois chitosanes

retenues pour préparer les nanoparticules chitosane/ODNdb-ApoB et chitosane/siARN-ApoB sont les formulations de chitosane 92-10-5, 80-10-10 et 80-80-5 (DD-MM-N:P). Les nanoparticules ont été préparées selon un ratio de charges chitosane : acides nucléiques (N:P) de 5 ou de 10.

Tableau 3.1: Les différentes formulations de chitosane utilisées dans le projet de recherche, selon chaque expérience.

Chitosane	Expériences	DD [%]	Mn [kDa]	MM [kDa]	PDI
92-10	Étude de stabilité, DLS, ESEM	92	7,10	10	1,4
	Étude de protection, cytométrie en flux, qRT-PCR, Étude <i>in vivo</i>	92	8,50	10	1,4
	Rhodamine-92-10 : Microscopie confocale	92	10,0	10	1,4
80-80	Caractérisation physico-chimique	80	93,8	80	2,0
	Cytométrie en flux	80	71,5	80	1,6
80-10	Caractérisation physico-chimique	80	12,4	10	1,8
	Cytométrie en flux	80	10,8	10	1,3

3.1.2.1 Préparation des ratios N:P

Les poudres de chitosane ont été dissoutes une nuit à température de la pièce dans l'acide chlorhydrique en utilisant un ratio 1:1 de glucosamine : HCl de manière à obtenir une concentration de 5 mg/mL. Les solutions ont ensuite été stérilisées par filtration avec un filtre de 0,2 µm. Afin d'obtenir des ratios N:P spécifiques (5 et 10), les solutions ont été diluées avec de l'eau désionisée. La dilution du chitosane nécessaire pour obtenir le ratio N:P désiré est calculée selon l'équation 3.1 suivante :

$$V_i = \left(\left(\frac{V_{siARN} \times C_{siARN}}{MM_{siARN}} \right) \times Ratio\ désiré \right) \times \left(\frac{MM_{chitosane}}{\left(\frac{DD}{100} \right) \times V_{chitosane} \times C_{initiale\ chitosane}} \right) \times V_{final\ total} \quad (3.1)$$

Où V_i [µL] correspond au volume de chitosane devant être dilué dans l'eau désionisée, tandis que V_{siARN} , $V_{chitosane}$ et $V_{final\ total}$ [µL] correspondent respectivement aux volumes égaux de siARN (ou

ODNdb) et de chitosane (au ratio N:P désiré) devant être mélangés ensemble pour former les nanoparticules, totalisant le volume final. Les termes MM_{siARN} (309 g/mol) et $MM_{\text{chitosane}}$ (92-10 : 164.6 g/mol et 80-10 ou 80-80 : 169.6 g/mol) sont les masses molaire moyennes des siARN (ou ODNdb) et des monomères de chitosane, respectivement; C_{siARN} et $C_{\text{initiale chitosane}}$ [$\mu\text{g}/\mu\text{L}$] sont les concentrations des solutions de siARN (ou ODNdb) et de chitosane utilisées, respectivement; DD est le degré de désacétylation [%].

3.1.3 Formation des nanoparticules chitosane/acides nucléiques

La solution de chitosane (92-10-5, 80-80-5 ou 80-10-10) préparée tel que décrit dans la section 3.1.2 de ce chapitre, a été ajoutée dans un tube Eppendorf de 1,5 ml contenant un volume égal d'ODNdb-ApoB ou de siARN-ApoB à une concentration variant de 0,05 à 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (préparé dans l'eau désionisée et stérile). Les solutions ont été immédiatement et vigoureusement mélangées par pipetage puis ont été incubées durant 30 minutes à la température de la pièce. Les volumes de chitosane et d'acides nucléiques utilisés pour préparer les nanoparticules peuvent varier entre 20 μL et 100 μL selon les besoins des expériences. Par contre, il est primordial de garder des volumes égaux de chitosane et d'ODNdb-ApoB ou de siARN-ApoB.

3.2 Caractérisation physico-chimique des nanoparticules chitosane/ODNdb-ApoB

3.2.1 Détermination de la taille et du potentiel ζ des nanoparticules chitosane/ODNdb-ApoB

La taille, le potentiel ζ et le PDI des nanoparticules chitosane/ODNdb-ApoB ont été déterminés en utilisant l'appareil Zetasizer Nano ZS (DLS, Malvern Zetasizer Nano ZS, Malvern, Worcestershire, UK). La taille, le diamètre hydrodynamique, des nanoparticules chitosane/ODNdb-ApoB a été déterminée par diffusion dynamique de la lumière (DLS : *dynamic light scattering*) à un angle de 173° à 25°C . La détermination de la taille des nanoparticules permettrait d'estimer la capacité des nanoparticules à franchir les barrières biologiques impliquées dans la livraison systémique de siARN.

Une des conséquences du potentiel ζ est l'importance de la répulsion ou de l'attraction entre les particules. Plus précisément, le potentiel ζ correspond au potentiel à la surface extérieure de la double couche électrique d'une particule, qui est en fait une région contenant une concentration élevée d'ions de charge opposée à celle de la particule. Le potentiel ζ a été mesuré en utilisant le même instrument et les mêmes conditions que pour la mesure de la taille des nanoparticules. La vélocimétrie à rayon laser à effet Doppler est utilisée par l'instrument afin de mesurer la vitesse de déplacement des nanoparticules dans un champ électrique. Ainsi, l'instrument peut calculer le potentiel ζ des nanoparticules en considérant leur mobilité électrophorétique. La détermination du potentiel ζ est très importante étant donné la grande influence de la charge des nanoparticules sur l'interaction avec les cellules et leur comportement dans un milieu physiologique.

Les nanoparticules ont été formées avec une solution d'ODNdb-ApoB à une concentration de 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ et avec les différentes formulations de chitosane (92-10-5, 80-80-5 et 80-10-10) tel que décrit dans la section 3.1.3 de ce chapitre. Les nanoparticules ont été diluées dans du NaCl 10 mM suivant un ratio 1:10 (nanoparticules : NaCl). Un volume de 500 μL de la solution de nanoparticules diluées dans du NaCl a été placé dans une cuvette (759075D, Plastibrand®, Brand, Wertheim, Allemagne). La cuvette a été insérée dans l'appareil où trois séries de dix mesures ont été programmées afin de déterminer la taille par intensité et le PDI des nanoparticules. Ensuite, 500 μL de NaCl ont été ajoutés au 500 μL de la solution initiale et la solution résultante a été transférée dans une cuvette destinée à la mesure du potentiel ζ (cellule capillaire jetable, DTS1061, Malvern Instruments, Worcestershire, UK). La cuvette a été insérée dans l'appareil préalablement programmé pour faire trois séries de 15 mesures.

3.2.2 Analyse des nanoparticules chitosane/ODNdb-ApoB par microscopie électronique à balayage environnemental

La microscopie électronique à balayage environnementale (ESEM : *environmental scanning electron microscopy*) a permis de déterminer la forme et la taille des nanoparticules chitosane/ODNdb-ApoB. Les nanoparticules ont été préparées avec une solution d'ODNdb-ApoB à une concentration de 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ et de différentes formulations de chitosane (92-10-5, 80-80-5 et 80-10-10) tel que décrit dans la section 3.1.3 de ce chapitre. Des contrôles de chitosane (92-10-5, 80-80-5 et 80-10-10) seul ont aussi été étudiés dans cette analyse. Les nanoparticules et

les contrôles ont été vaporisés sur un support de silicium et recouverts d'une mince couche d'or. La taille des particules d'or vaporisées a été ajustée à 1 à 2 nm par l'instrument Agar Manuel Sputter Coater (Marivac Inc., Lakefield, QC, Canada) de manière à éviter l'interaction avec les nanoparticules. Le support a ensuite été placé dans la chambre d'observation d'un microscope électronique à balayage environnemental (ESEM, Quanta 200 FEG, FEI Company Hillsboro, OR, USA). Les échantillons ont été observés sous vide élevé (*High Vacuum*). Le vide a été créé dans la chambre d'observation afin d'éviter l'obstruction du déplacement du faisceau d'électrons par les molécules d'air. Plusieurs images ont été prises à un grossissement de 800,000X et de 160,000X afin de déterminer la forme et l'homogénéité de la population de nanoparticules vaporisées sur le support de silicium. La taille des nanoparticules chitosane/ODNdb-ApoB a été déterminée par la mesure de plus de 150 nanoparticules en utilisant le logiciel du microscope XT Docu (XT Docu, FEI Co., Hillsboro, OR, USA). La taille des nanoparticules mesurée avec l'ESEM a permis de confirmer les mesures faites avec la DLS.

3.2.3 Analyse de la formation et de la stabilité des nanoparticules chitosane/ODNdb-ApoB

L'étude de stabilité des nanoparticules a permis de mettre en évidence la formation des nanoparticules à différents pH. Cette notion permet d'acquérir une idée sur la stabilité des nanoparticules chitosane/siARN-ApoB dans un milieu physiologique ou un milieu acide tel que celui retrouvé dans les endolysosomes. La technique d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE : *polyacrylamide gel electrophoresis*) a été utilisée afin d'analyser et de caractériser la formation et la stabilité des nanoparticules chitosane/ODNdb-ApoB. Les nanoparticules ont été formées avec une solution d'ODNdb-ApoB à une concentration de 0,33 µg/µL et de différentes formulations de chitosane (92-10-5, 80-80-5 et 80-10-10) tel que décrit dans la section 3.1.3. Après leur formation, les nanoparticules ont été incubées durant 0,5, 4 ou 20 heures dans différentes solutions tamponnées (pH 6,5, 7 et 8). Plus précisément, les nanoparticules ont été mélangées suivant un ratio 1:1 à une solution d'acide 2-(morpholin-4-yl) éthanesulfonique (MES) 2X (20 mM MES, 8 mM acétate de sodium, pH 6,5 ou 7) ou de tris-acétate-acide éthylènediaminetétracétique (TAE) 2X (2M Tris-acétate, 50 mM acide éthylènediaminetétracétique (EDTA), pH8). La migration s'est faite sur gel de polyacrylamide à

13 % (Solution acrylamide/Bis, BioRad Laboratories, Mississauga, ON, Canada) durant 120 minutes à un voltage constant de 100 V dans du MES 1X (pH 6,5). Les gels ont été colorés avec du bromure d'éthidium (0,5 µg/mL) (Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, ON, Canada) de manière à visualiser les ODNdb-ApoB. Les gels ont été visualisés en utilisant l'appareil Bio-Vision 3000 (Vilbert Lourmat, Marne-la-Vallée, France), tandis que leur analyse a été complétée à l'aide du logiciel Vision-Capt (Vilbert Lourmat, Marne-la-Vallée, France).

3.2.4 Étude de la protection, par le chitosane, des ODNdb-ApoB dans les nanoparticules contre la digestion par les nucléases.

Pour utiliser le chitosane comme système de livraison, il est nécessaire d'étudier son effet protecteur sur les acides nucléiques. Cette étude doit être réalisée afin d'évaluer la capacité des nanoparticules chitosane/siARN-ApoB à contrer la dégradation des siARN-ApoB dirigée par les nucléases retrouvées en milieu physiologique. Des nanoparticules formées avec une solution d'ODNdb-ApoB à une concentration de 0,33 µg/µL et de chitosane (92-10-5, 80-10-10 et 80-80-5), tel que décrit dans la section 3.1.3, ont été soumises à différentes doses d'ADNase I. Plus précisément, les nanoparticules chitosane/ODNdb-ApoB ont été incubées en présence de 0, 0,5, 1, 2 ou 5 unités d'ADNase I par µg d'ODNdb (AMP-D1, S2222, Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, ON, Canada), dans une solution de MES 1X contenant 2 mM de MgCl₂ durant 30 minutes à 37 °C. Ensuite, l'ajout d'EDTA (AMP-D1, S4809, Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, ON, Canada) à une concentration finale de 4,6 mM a permis l'arrêt de la réaction de l'ADNase I. Afin de libérer les ODNdb-ApoB des chaînes de chitosane, les échantillons ont été traités à la chitosanase *Streptomyces griseus* (C9830-10UN, Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, ON, Canada) à 10 mU/µL pendant 90 minutes à 37 °C. La réaction de la chitosanase a ensuite été arrêtée en disposant les échantillons à -20 °C pendant au moins 20 minutes (Alameh, et al., 2010). Enfin, les échantillons ont été migrés sur gel d'agarose à 5 % à un voltage constant de 90 V durant une heure puis le gel a été coloré avec du bromure d'éthidium (0,5 µg/mL). Les gels ont été visualisés en utilisant l'appareil Bio-Vision 3000 (Vilbert Lourmat, Marne-la-Vallée, France) et l'analyse a été complétée à l'aide du logiciel Vision-Capt (Vilbert Lourmat, Marne-la-Vallée, France).

La caractérisation physico-chimique des nanoparticules chitosane/ODNdb-ApoB a fourni la base nécessaire pour l'initiation de l'étude *in vitro*. En effet, sachant que les propriétés physico-chimiques des nanoparticules ont une influence sur leur efficacité de transfection cellulaire et leur efficacité de silençage génique, la caractérisation physico-chimique est essentielle pour l'évaluation des nanoparticules chitosane/acides nucléiques dans un milieu contrôlé *in vitro*.

3.3 Étude *in vitro*

3.3.1 Lignées cellulaires : conditions de culture et procédure de transfection

3.3.1.1 Culture cellulaire

Les lignées cellulaires HepG2, RAW264.7 et HEK293 (ATCC, Manassas, VA, USA) ont été utilisées dans le cadre de l'étude *in vitro*. L'utilisation des cellules hépatiques HepG2 a permis d'extrapoler l'efficacité des nanoparticules chitosane/siARN-ApoB ou ODNdb-ApoB dans un modèle *in vivo*, plus spécifiquement au niveau du foie où est sécrétée l'ApoB. De plus, les cellules macrophages d'origine murine RAW264.7 ont été utilisées afin de déterminer l'efficacité des nanoparticules avec des cellules de souris. Les HEK293 ont été utilisées en tant que modèle cellulaire de base, utilisées dans de nombreuses études *in vitro* entre autre pour déterminer l'efficacité des systèmes de livraison. Les cellules HEK293 et RAW264.7 ont été cultivées dans du milieu modifié d'Eagle par Dulbecco (DMEM : *Dulbecco's modified Eagle's medium*) à glucose élevé (12100-046, Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA ou 30-2002, ATCC, Manassas, VA, USA) avec 1,85 g/L et 1,5 g/L de NaHCO₃ (S-5761, Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, ON, Canada), respectivement. Les cellules HepG2 ont été cultivées dans du milieu essentiel minimum d'Eagle (EMEM : *Eagle's minimal essential medium*) (30-2003, ATCC, Manassas, VA, USA). Les cellules ont été cultivées dans du milieu de culture complet contenant 8 % (HepG2) ou 10 % (HEK293 et RAW264.7) (volume/volume) de sérum fœtal de bœuf (FBS : *fetal bovine serum*) (26140079, Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) et elles ont été conservées à 37 °C dans un incubateur ajusté à 5 % de CO₂.

3.3.1.2 Méthode de transfection des cellules *in vitro* avec les nanoparticules chitosane/acides nucléiques

Les cellules ont étéensemencées avec 100 μL /puits ou 500 μL /puits de milieu de culture complet dans des plaques de culture de 96 ou 24 puits, respectivement. Le nombre de cellulesensemencées a été choisi de manière à obtenir une confluence d'environ 50 % la journée de la transfection. Le milieu de transfection correspond à du DMEM à glucose élevé (12100-046, Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) contenant 5 mM de MES et 10 mM de NaHCO_3 . Le milieu de transfection a été équilibré à un pH de 6,5 en utilisant du HCl 1N stérile (H9892, Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, ON, Canada) puis incubé pendant 24 heures à 37 °C et 5 % de CO_2 . Le jour de la transfection, le pH du milieu de transfection a été mesuré et ajusté si nécessaire à un pH de 6,5. Le milieu de culture couvrant les cellules a été aspiré, puis un volume de 100 μL /puits ou 500 μL /puits de milieu de transfection contenant respectivement 60 pmol ODNdb-ApoB/puits ou 10 pmol siARN-ApoB/puits a été déposé sur les cellules. Cette manipulation a été exécutée rapidement pour éviter la variation de pH du milieu de transfection due au contact avec l'air ambiant. Après l'ajout des nanoparticules, les plaques de 96 ou 24 puits ont été incubées durant 24 heures à 37 °C et 5 % de CO_2 .

3.3.1.3 Méthode de transfection des cellules *in vitro* avec les lipoplexes

Les lipoplexes formés de lipides DharmaFECTTM1, produit par la compagnie Dharmacon (Thermo Fisher Scientific, Dharmacon RNAi Technologies, Lafayette, CO., USA), et d'ODNdb-ApoB ou de siARN-ApoB ont été utilisés comme contrôle positif lors des transfections cellulaires. Avant la formation des lipoplexes, une solution d'ODN-ApoB ou de siARN-ApoB à 2 μM a été mélangée à un volume identique de milieu de culture sans sérum dans un tube Eppendorf 1,5 mL. Dans un second tube, une solution de lipides DharmaFECTTM1 a été préparée en diluant la solution mère de DharmaFECTTM1 dans du milieu de culture sans sérum suivant un ratio 1:25 (DharmaFECTTM1 : milieu de culture sans sérum), de manière à obtenir le même volume que la solution d'acides nucléiques du premier tube. Après cinq minutes d'incubation à la température de la pièce, le contenu des tubes a été mélangé par pipetage. Le mélange a été incubé durant 20 minutes à la température de la pièce afin d'assurer la formation des lipoplexes DharmaFECTTM1/acides nucléiques. Après l'incubation, la solution de lipoplexes a été diluée

dans du milieu complet avec sérum suivant un ratio 1:4 (lipoplexes : milieu complet), puis mélangé délicatement par pipetage. Le milieu de culture recouvrant les cellules à transfecter a été enlevé et remplacé par 100 μL /puits ou 500 μL /puits de milieu contenant les lipoplexes pour une plaque de 96 ou 24 puits, respectivement. Les plaques ont été incubées durant 24 heures à 37 °C et 5 % de CO_2 .

3.3.2 Étude de l'internalisation des nanoparticules chitosane/ODNdb-ApoB par cytométrie en flux et microscopie confocale

3.3.2.1 Analyse par cytométrie en flux

L'étude de l'internalisation cellulaire a permis d'évaluer la capacité des nanoparticules chitosane/ODNdb-ApoB de transfecter différentes lignées cellulaires. L'analyse par cytométrie en flux a permis de comprendre la barrière biologique que représente la membrane cellulaire. L'étude de l'internalisation cellulaire repose sur des nanoparticules formées avec une solution d'ODNdb-ApoB marqués à une concentration de 0,05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ avec 5' 6-FAM et de différentes formulations de chitosane (92-10-5, 80-80-5 et 80-10-10), tel que décrit dans la section 3.1.3. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission du 5' 6-FAM sont présentées dans la section 3.1.1 de ce chapitre. Les lipoplexes DharmaFECTTM1/ODNdb-ApoB (5' 6-FAM) ont été utilisés comme contrôles positifs de transfection, tel que décrit dans la section 3.3.1.3. 24 heures après la transfection des nanoparticules chitosane/ODNdb-ApoB, décrite dans la section 3.3.1.2, les cellules HepG2, HEK293 et RAW264.7 ont été traitées par la chitosanase *Streptomyces griseus* en ajoutant 30 mU de chitosanase par puits et en incubant les cellules durant 60 minutes à 37 °C et 5 % de CO_2 . Le traitement par la chitosanase a permis de dégrader le chitosane toujours lié aux membranes cellulaires (Alameh, et al., 2010). Ensuite, les cellules ont été lavées deux fois au tampon phosphate salin (PBS : *phosphate buffered saline*), elles ont été traitées avec de la trypsine-EDTA 0,25 % (25200072, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) et elles ont été resuspendues dans du PBS. L'analyse a été faite avec un cytomètre en flux BD Canto (BD, Franklin Lakes, NJ USA). L'excitation des cellules contenant les marqueurs 5' 6-FAM a été faite avec un laser de 488 nm et la détection a été faite avec un filtre à bande passante de 530/30 nm. Les cellules non-transfectées ont été utilisées en tant que contrôles négatifs pour différencier les cellules contenant

les marqueurs 5' 6-FAM et l'auto-fluorescence. Le pourcentage de cellules contenant les marqueurs a été considéré comme étant le taux d'efficacité de transfection des nanoparticules.

3.3.2.2 Analyse par microscopie confocale

Afin de confirmer les résultats obtenus en cytométrie en flux, l'internalisation des nanoparticules chitosane/ODNdb-ApoB a été observée en microscopie confocale. La microscopie confocale a permis d'observer les événements survenant à l'intérieur de la cellule où se déroule la libération endolysosomale des nanoparticules. Cette technique a aussi permis d'observer la dissociation entre le chitosane et les ODNdb-ApoB dans le cytoplasme. Le chitosane (92-10-5) et les ODNdb-ApoB (0,05 µg/µL) formant les nanoparticules (section 3.1.3) ont été marqués, respectivement, à la rhodamine B isothiocyanate (RITC) fluorescente (Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, ON, Canada) et au 5' 6-FAM (IDT, Integrated DNATechnologies, Inc., Coralville, Iowa). La rhodamine possède une excitation et une émission maximales à des longueurs d'onde de 540 nm et 625 nm respectivement. Les nanoparticules chitosane/ODNdb-ApoB ont émis un signal de couleur jaune étant donné le chevauchement des signaux de couleur rouge de la rhodamine (chitosane) et verte du 5' 6-FAM (ODNdb-ApoB). Les cellules HepG2, HEK293 et RAW264.7 ont été mises en culture dans des petits plateaux de type « pétri à fond de verre » (*glass bottom petri*, P35G-1.5-14-C, MatTek, Ashland, MA, USA) de 1,9 cm de diamètre. Environ 5×10^4 cellules HepG2, $3,5 \times 10^4$ cellules HEK293 et 2×10^4 cellules RAW264.7 ont été mises en culture par plateau. Après 24 heures d'incubation à 37 °C et 5 % de CO₂, les cellules ont été transfectées tel que décrit dans la section 3.3.1.2 de ce chapitre. Les cellules ont été incubées durant 24 heures avec un milieu de transfection à pH 6,5 contenant les nanoparticules soit l'équivalent de 185 pmol ODNdb-ApoB marqués/puits. Ensuite, les membranes cellulaires ont été colorées en bleu avec 2,5 µg/mL de CellMaskTM (H32720, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) dans du milieu de transfection à 37 °C durant cinq minutes. Ce colorant est composé d'un fluorochrome possédant une excitation et une émission maximales à des longueurs d'onde de 346 nm et 442 nm respectivement. Après la coloration, les cellules ont été lavées deux fois avec du PBS et recouvertes de milieu de culture complet avec sérum. La coloration des membranes cellulaires a permis de délimiter les cellules afin de mieux visualiser la distribution des nanoparticules. Les cellules transfectées ont été observées avec le microscope confocal Zeiss LSM510 META

Axioplan 200 (Carl Zeiss Canada Ltd., Toronto, ON, Canada). Les images ont été prises avec un objectif à immersion à l'huile de 63X possédant une ouverture numérique équivalente à 1.

3.3.3 Quantification relative du niveau d'expression de l'ARNm codant pour l'ApoB par qRT-PCR

3.3.3.1 Extraction d'ARN et méthode d'évaluation

Les nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB, formées avec une solution de siARN-ApoB à une concentration de 0,05 µg/µL, ont été utilisées pour la transfection de cellules HepG2. Les cellules ont été transfectées par des nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN et des lipoplexes DharmaFECTTM1/siARN tel que décrit à la section 3.3.1.2 et la section 3.3.1.3, respectivement. Des nanoparticules chitosane/siARN leurres (section 3.1.1) ont été utilisées en tant que contrôle négatif de silençage, tandis que les lipoplexes DharmaFECTTM1/siARN-ApoB ont servi de contrôle positif. Les cellules ont été traitées à la chitosanase *Streptomyces griseus* 24 heures après le début de la transfection par l'ajout de 10 mU de chitosanase par puits, suivi d'une incubation de 60 minutes à 37 °C et 5 % de CO₂. Le chitosane a été digéré par la chitosanase pour faciliter l'extraction d'ARNm anioniques pouvant se lier à des sites cationiques présents sur les chaînes de chitosane (Alameh, et al., 2010). L'extraction de l'ARN total a été effectuée en utilisant le kit d'extraction RNA XS[®] selon les spécifications du manufacturier (MCN74090250, Macherey-Nagel, Biolynx, Brockville, ON, Canada). La quantité et l'intégrité de l'ARN total ont été déterminées en utilisant un BioAnalyzer 2100 de Agilent (Agilent Technologies, Mississauga, ON, Canada) d'après le protocole du fabricant. L'intégrité de l'ARN a été évaluée par le ratio de 28S/18S d'ARN ribosomal (Skrypina, Timofeeva, Khaspekov, Savochkina, & Beabealashvilli, 2003) et le nombre d'intégrité d'ARN (RIN : *RNA integrity number*). Le RIN est la mesure d'intégrité relative de l'ARN (*relative integrity number*), basée essentiellement sur le profil des bandes de migration.

3.3.3.2 Réaction de transcription inverse à partir de l'ARN total

La synthèse de l'ADNc a requis la dénaturation de l'ARN total par une incubation à 60 °C pendant 10 minutes. L'ADNc a été synthétisé en utilisant le kit QuantiTect[®] Reverse

Transcription (205311, QIAGEN, Toronto, ON, Canada) selon les instructions du manufacturier. Brièvement, 200 à 500 mg d'ARN total ont premièrement été traités dans une solution de digestion d'ADN incluant le volume d'ARN total traité, 2 µL de solution d'ADNase (*gDNA Wipeout buffer*, 7X) et un volume d'eau exempte de ribonucléases (ARNase) (*RNAse-free*) complétant la solution de digestion d'ADN à 14 µL. La solution a été incubée deux minutes à 42 °C, puis placée immédiatement sur glace. Ensuite, la solution de digestion d'ADN a été transférée dans un tube contenant le mélange de transcription inverse, totalisant 20 µL. Le mélange de transcription inverse a compris 1 µL de transcriptase inverse Quantiscript (comprenant les inhibiteurs d'ARNase), 4 µL de tampon de transcription inverse Quantiscript 5X (comprenant du Mg^{2+} et les désoxyribonucléosides triphosphate (dNTP) et 1 µL d'un mélange d'amorces. La réaction de transcription inverse par amplification en chaîne par polymérase (PCR : *polymerase chain reaction*) a été effectuée dans un thermocycleur programmable Rotor-GeneTM6000 (Corbett Life Science, NSW, Australie). La réaction a été effectuée à 42 °C pendant 30 minutes, puis les enzymes ont été désactivées à 95 °C pendant trois minutes. L'ADNc a été conservé à -80 °C et décongelé la journée de l'amplification de l'ADNc.

3.3.3.3 Amplification en chaîne par polymérase en temps réel de l'ARNm codant pour l'ApoB

Les niveaux d'expression de l'ARNm ApoB ont été déterminés par amplification quantitative en chaîne par polymérase en temps réel (qRT-PCR : *quantitative real-time polymerase chain reaction*) en utilisant la technique TaqMan[®]. L'amplification a été réalisée en utilisant les sondes universelles de la librairie de Roche (UPL : *universal probe library*) (Roche applied science, Laval, QC, Canada). La sonde UPL # 55 a été choisie pour les réactions qRT-PCR. Les réactions qRT-PCR ont été réalisées dans des plaques de 384 puits en utilisant 2 µL d'ADNc, 5 µL de *Fast Universal qPCR MasterMix* 2X (4352042, Applied Biosystems, Streetsville, ON, Canada), 2 µM de chaque amorce (sens et antisens) et 1 µM de sondes UPL # 55, totalisant un volume de 10 µL/puits. Similairement, les niveaux d'expression du contrôle endogène glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH : *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) ont été déterminés par des tests d'expression génique de TaqMan[®] pré-validés (ABI, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). Ces réactions qRT-PCR ont été faites dans des plaques de 384

puits par le mélange de 2 µL d'ADNc, 5 µL de *Fast Universal qPCR MasterMix 2X*, 0,5 µL de *TaqMan Gene Expression Assay 20X* (sonde GAPDH et amorces sens et antisens, Hs02758991_g1, 4331182, ABI, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) et 2,5 µL d'eau exempte d'ARNase (*RNAse-free*) de manière à obtenir un volume total de 10 µL. Toutes les réactions ont été menées en triplicata technique et biologique.

Le système de détection de séquence PRISM® 7900HT d'ABI (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) a été utilisé pour la détection du niveau d'amplification d'ARNm tel que décrit par Alameh *et al.* (Alameh, et al., 2010). L'instrument a été programmé avec une première étape à 95 °C durant trois minutes, suivi de 45 cycles de cinq secondes à 95 °C et 30 secondes à 60 °C. Les valeurs moyennes du cycle seuil (C_t : *cycle threshold*) ont été utilisées pour la quantification de l'expression de l'ARNm ApoB. Cette quantification relative a été faite avec la méthode $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak & Schmittgen, 2001b). Premièrement, les valeurs du C_t du gène ApoB (C_{tApoB}) ont été comparées au contrôle GAPDH (C_{tGAPDH}) (équation 3.2). Ensuite, cette différence ($\Delta C_{t\text{échantillon}}$) a été comparée au calibrateur ($C_{t\text{calibrateur}}$) correspondant aux échantillons extraits des cellules non-transfectées (équation 3.3) (Livak & Schmittgen, 2001a). Connaissant $\Delta\Delta C_t$, il a été possible de calculer l'expression relative (équation 3.4). L'expression relative a été calculée en utilisant le logiciel Sequence Detection System 2.2.2 (ABI, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA).

$$\Delta C_{t\text{échantillon}} = C_{tApoB} - C_{tGAPDH} \quad (3.2)$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t\text{échantillon}} - C_{t\text{calibrateur}} \quad (3.3)$$

$$\text{Expression relative} = 2^{-\Delta\Delta C_t} \quad (3.4)$$

L'environnement contrôlé dans lequel les expériences *in vitro* ont eu lieu a fourni la base expérimentale nécessaire à l'évaluation de l'efficacité des nanoparticules à franchir les barrières biologiques cellulaires et à inhiber l'expression de l'ARNm ApoB. Combinée à la caractérisation physico-chimique, l'étude *in vitro* a permis de mettre en évidence le potentiel des nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB. En effet, la taille, le potentiel ζ , la stabilité et le niveau de protection des nanoparticules jouent un rôle primordial dans l'efficacité *in vivo* des nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB. Ainsi, une étude *in vivo* a permis d'élaborer une preuve de concept entourant la possibilité d'induire la diminution sécrétaire de la sécrétion

de l'ApoB dans un modèle murin athérosclérotique par la livraison intraveineuse de nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB.

3.4 Étude *in vivo* chez les souris C57BL/6

3.4.1 Manipulation des souris C57BL/6

3.4.1.1 Gestion des souris C57BL/6

L'étude *in vivo* a été faite avec un modèle *mus musculus* de souche C57BL/6 (Charles River, Sherbrooke, QC, Canada). Les souris C57BL/6 ont été choisies en raison de leur développement accéléré de l'obésité et de l'athérosclérose lorsqu'elles sont nourries avec une diète riche en gras. Les expériences sur les souris ont été réalisées en suivant un protocole (Protocole 10-074) approuvé par le Comité de déontologie de l'expérimentation sur les animaux (CDEA) de l'Université de Montréal. Les souris ont été logées au Pavillon Liliane-de-Stewart de l'Université de Montréal et soumises à un cycle de lumière de 12 heures. Les souris ont été identifiées par un perçage aux oreilles, puis elles ont été placées quatre par cage de façon à ce que chacune des cages correspondent à un groupe expérimental, tel que présenté dans le Tableau 3.2. À leur arrivée, les souris de quatre semaines de sexe masculin ont eu une semaine d'acclimatation durant laquelle elles ont été nourries avec une diète normale (D12450B - Research Diets, New Brunswick, NJ, USA). Ensuite, tous les groupes à l'exception du groupe non-athérosclérotique (groupe D μ) ont amorcé une diète riche en gras (Tableau 3.2) (D12492-Research Diets, New Brunswick, NJ, USA) pour une période de huit semaines. Au commencement de la diète riche en gras, le premier jour d'expérimentation (J0) correspond au 29-06-11 (Tableau 3.3). Chaque semaine, les souris ont été pesées et leurs états physique et comportemental ont été observés et documentés.

Trois groupes contrôles ont été utilisés dont un contrôle positif d'athérosclérose (D α) et un contrôle négatif d'athérosclérose (D μ) ainsi qu'un groupe athérosclérotique recevant des injections de siARN-ApoB seuls (D β) (Tableau 3.2 et 3.3). Les souris des groupes C1-C5 ont reçu des injections de nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB à différents moments du développement de l'athérosclérose (Tableau 3.2 et 3.3). Le groupe C6 a été créé à partir de souris

athérosclérotiques afin d'observer l'effet à court terme d'une seule injection sur le développement de la maladie (Tableau 3.2 et 3.3). La nécropsie de tous les animaux a été faite après huit semaines d'expérimentation, sauf pour le groupe C6 sacrifié après sept semaines (Tableau 3.3). Les différentes conditions expérimentales ainsi que les jours d'injections et de prélèvements sanguins spécifiques à chaque groupe sont présentés dans le Tableau 3.2. Les injections et les sacrifices ont été réalisés en fonction d'un calendrier prédéfini présenté dans le Tableau 3.3.

Tableau 3.2: Conditions expérimentales et jours d'injections et de prélèvements sanguins pour tous les groupes de souris.

	Groupe	Nombre	Souche	Description du traitement	Injections	Prélèvements sanguins ²
Conditions testées	C1	n=3	C57BL/6	3 injections de <u>nanoparticules</u> préventives débutant au même moment que la diète riche en gras	1 injection au jour : J1, J8 et J15	Au jour J1 (à 3h, 6h, 24h et 48h post-injection), puis aux jours J8, J15 et J29
	C2	n=4	C57BL/6	3 injections de <u>nanoparticules</u> après 1 semaine de diète riche en gras	1 injection au jour : J8, J15 et J22	Au jour J8 (à 3h, 6h, 24h et 48h post-injection), puis aux jours J15, J22 et J36
	C3	n=4	C57BL/6	3 injections de <u>nanoparticules</u> après 2 semaines de diète riche en gras	1 injection au jour : J15, J22 et J29	Au jour J15 (à 3h, 6h, 24h et 48h post-injection), puis aux jours J22, J29 et 43
	C4	n=4	C57BL/6	3 injections de <u>nanoparticules</u> après 3 semaines de diète riche en gras	1 injection au jour : J22, J29 et J36	Au jour J22 (à 3h, 6h, 24h et 48h post-injection), puis aux jours J29, J36 et 50
	C5	n=4	C57BL/6	3 injections de <u>nanoparticules</u> après 4 semaines de diète riche en gras	1 injection au jour : J29, J36 et J43	Au jour J29 (à 3h, 6h, 24h et 48h post-injection), puis aux jours J36, J43, j57
	C6	n=2	C57BL/6	1 injection de <u>nanoparticules</u> après 7 semaines de diète riche en gras	1 injection au jour : J50	Aux jours J22, J36 et J50
Contrôles	D α	n=2	C57BL/6	Diète riche en gras sans injection	Aucune	Aux jours J22, J36 et J50
	D β	n=4	C57BL/6	3 injections de <u>siARN-ApoB seuls</u> après 3 semaines de diète riche en gras	1 injection au jour : J22, J29 et J36	Au jour J21 (à 3h, 6h, 24h et 48h) post-injection, puis aux jours J28, J35 et J49
	D μ	n=4	C57BL/6	Diète contrôle normale sans injection	Aucune	Aux jours J22, J36 et J50
Total		n=31	C57BL/6			

² Seul le premier jour de prélèvement a compris quatre prélèvements à différentes heures. Un prélèvement/jour a été fait pour les trois autres jours.

Tableau 3.3: Calendrier des injections et des sacrifices

Groupes									
Jours	C1 (n=3)	C2 (n=4)	C3 (n=4)	C4 (n=4)	C5 (n=4)	C6 (n=2)	Dα (n=2)	Dβ (n=4)	Dμ (n=4)
23/11/10	Acclimatation (Tous les groupes)								
30/11/10	Injection 1								
07/11/10	Injection 2	Injection 1							
14/12/10	Injection 3	Injection 2	Injection 1						
21/12/10		Injection 3	Injection 2	Injection 1				Injection 1	
28/12/10			Injection 3	Injection 2	Injection 1			Injection 2	
04/01/10				Injection 3	Injection 2			Injection 3	
11/01/11					Injection 3				
18/01/11						Injection 1			
20/01/11						Euthanasie C6			
26/01/11	Euthanasie C1, C2, C3								
27/01/11				Euthanasie C4, C5			Euthanasie D α , D β , D μ		

3.4.1.2 Les injections de nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB

Une dose de 1 mg de siARN-ApoB par kg de souris (1 mg/kg) a été administrée aux animaux traités (groupe C1-C6), incluant les souris du groupe recevant les siARN-ApoB seuls (groupe D β). Les souris des groupes C1-C5 ont reçu une dose de 1 mg/kg en trois injections, soit une injection de nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB par semaine durant trois semaines, tel que présenté dans les Tableaux 3.2 et 3.3. Par contre, les souris du groupe C6 n'ont reçu qu'une seule injection de nanoparticules. De plus, les souris du groupe D β ont reçu des injections de siARN-ApoB seuls suivant le même patron d'administration que les souris traitées du groupe C4 (Tableau 3.3). Les nanoparticules ont été formées en mélangeant une solution de siARN-ApoB à une concentration de 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ et une solution de chitosane 92-10-5, tel que décrit dans la section 3.1.3. À partir de la pesée hebdomadaire de chaque souris, la masse de siARN-ApoB devant être administrée aux souris des groupes C1-C6 et D β a été calculée pour chaque injection. Les masses moyennes de siARN-ApoB administrés en une ou trois injections pour chaque groupe sont présentées dans la Figure 3-1. Le poids moyen de chaque groupe de souris au moment de chaque injection peut être déterminé en divisant la masse moyenne de siARN-ApoB injectée (Figure 3-1) par la dose de 1 mg/kg ([=] 1 $\mu\text{g}/\text{g}$) administrée aux souris. Dépendamment du poids des souris, différents volumes inférieurs à 200 μL ont été administrés. Les injections ont été réalisées par voie intraveineuse à la queue en utilisant des seringues de 0,3 mL comportant une aiguille 29G (MonojectTM, Kendall, Covidien, Mansfield, MA, USA). Très peu d'injections péri-veineuses ou pertes de matériel ont été documentées.

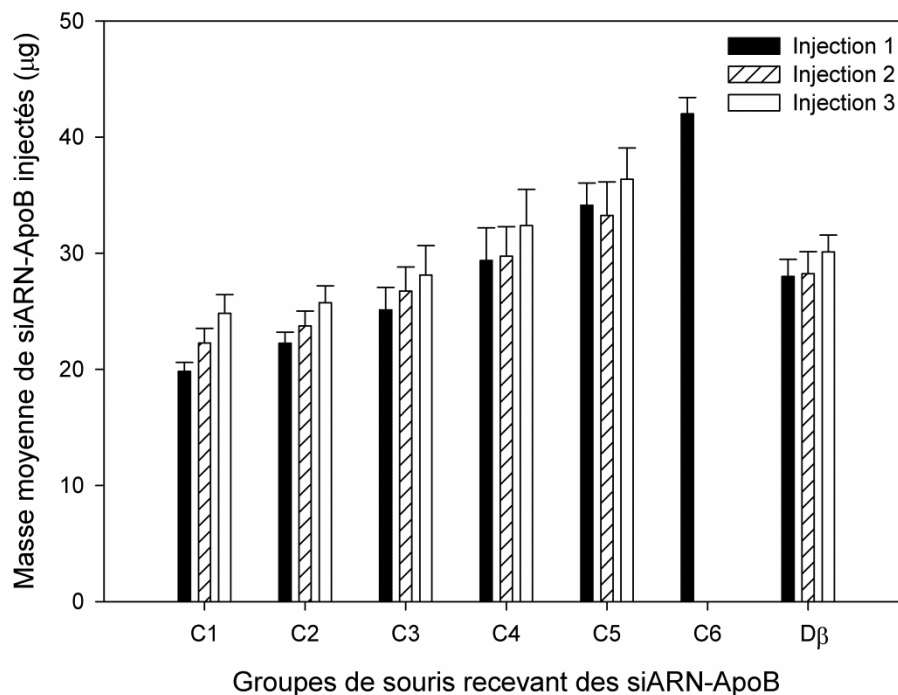


Figure 3-1 : Masses moyennes (µg) de siARN-ApoB administrés en trois injections pour les souris des groupes C1 à C5 et Dβ, ainsi que pour la seule injection des souris du groupe C6.

3.4.1.3 Les prélèvements sanguins

Les prélèvements sanguins ont été faits par ponction à l'artère de la queue ou à la veine saphène. Des prélèvements ont été effectués avant chaque injection et deux semaines après la dernière injection (prélèvements A, B, C et D), pour les groupes C1-C5 et Dβ. De plus, des prélèvements ont été faits 3, 6, 24 et 48 heures après la première injection (prélèvements 1, 2, 3 et 4) chez les souris des groupes C1-C5 et Dβ, tel que présenté dans le Tableau 3.2. Trois prélèvements ont été faits aux groupes C6, Dα et Dμ. Le sang prélevé a été placé dans des tubes permettant la séparation du sérum (BD Microtainer™ Gold, 365956, BD, Franklin Lakes, NJ, USA). Plus précisément, après 30 minutes de coagulation sanguine, les tubes contenant le sang ont été centrifugés durant deux minutes à 13000 ×g. Le sérum récolté a été transféré dans un tube Eppendorf de 1,5 mL exempt d'ARNase (*RNAse-free*) (02-681-331, Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada) et entreposé à -80 °C.

3.4.1.4 La nécropsie

Les souris sacrifiées ont d'abord été anesthésiées par inhalation d'oxygène et d'isoflurane (Forane, Baxter, Deerfield, IL, USA) à un dosage de 3 %. L'anesthésie a été maintenue en gardant le conduit de gaz sur le museau des animaux afin d'effectuer une ponction cardiaque. La ponction cardiaque a été réalisée en utilisant une aiguille Vacutainer® à échantillons multiples 22G (367211, Becton Dickinson Canada, Mississauga, ON, Canada) installée dans un adaptateur Vacutainer® (367290, Becton Dickinson Canada, Mississauga, ON, Canada) supportant un tube séparateur de sérum Monoject™ Corvac™ (capuchon rouge/gris, 8881302072, Covidien, Mansfield, MA, USA). Après 30 minutes de coagulation sanguine, les tubes séparateurs de sérum Monoject™ Corvac™ ont été centrifugés 10 minutes à 3900 ×g et le sérum a été entreposé dans des tubes Eppendorf de 1,5 mL exempts d'ARNase (*RNAse-free*) à -80 °C. Suite à la ponction cardiaque les souris ont été placées dans un contenant hermétique, préalablement rempli de CO₂, permettant l'euthanasie. Le foie, le jéjunum, les reins, les poumons, le cœur et la queue ont été récoltés et fixés dans du formol neutre tamponné (NBF : *neutral buffered formalin*) 10 % à 4 °C (SF1004, Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada). La lumière du jéjunum a été préalablement lavée avec du PBS 10 % et elle a été remplie de NBF 10 % afin de faciliter l'analyse histologique. Les poumons ont aussi été remplis de NBF 10 % avant l'entreposage. De petits échantillons de foie et de jéjunum ayant une masse de 50-100 mg ont été prélevés et conservés à -80 °C dans des tubes Eppendorf de 1,5 mL exempts d'ARNase (*RNAse-free*) dans le but d'extraire l'ARN total.

3.4.2 Analyse d'hépatotoxicité

L'analyse d'hépatotoxicité a permis d'évaluer les effets néfastes des nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB sur les cellules hépatiques. Au moment de la nécropsie, des échantillons de sérum d'environ 350 µL appartenant aux souris C5-2 (souris # 2 du groupe C5) et Dα-1 (souris # 1 du groupe Dα) ont été envoyés au laboratoire VITA-TECH (IDEXX Laboratories, VITA-TECH Canada, Markham, ON, Canada) dans le but de mesurer les concentrations d'albumine, de bilirubine, de phosphatase alcaline (ALP : *alkaline phosphatase*), d'alanine aminotransférase (ALT), d'aspartate aminotransférase (AST) et de gamma glutamyl-

transpeptidase (GGT). Les échantillons de sérum livrés chez VITA-TECH ont été transportés sur glace dans des tubes Eppendorf 1,5 mL exempts d'ARNase (*RNASE free*).

3.4.3 Détermination de la réduction d'ApoB en circulation

La détection de l'ApoB en circulation a permis d'évaluer un des effets phénotypiques induits par les injections intraveineuses de nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB. L'importance et la durée de la réduction d'ApoB ont été un indicatif important de l'efficacité des nanoparticules injectées. L'ApoB en circulation dans le sérum a été mesurée par un ELISA en sandwich commercial spécifique à l'ApoB murin (E92003Mu, Uscn Life Science Inc., Chine). Les échantillons de sérum ont été décongelés sur glace et analysés immédiatement. Brièvement, ce système d'ELISA en sandwich comporte une plaque de 96 puits dont le fond des puits est couvert d'anticorps monoclonaux spécifiques à l'ApoB de souris. Les échantillons de sérum ont été dilués dans du PBS selon un ratio 1:100 (sérum : PBS). Les échantillons de sérum dilués, les différentes dilutions de standards et le blanc ont été ajoutés dans leur puits respectif (100 μ L/puits). Après une incubation de deux heures à 37 °C, les puits ont été vidés sans lavage. Des anticorps polyclonaux, conjugués à la biotine, spécifiques à l'ApoB de souris ont été ajoutés aux puits (100 μ L/puits), puis les puits ont été incubés à 37 °C pendant une heure. Suite à l'incubation, les puits ont été lavés trois fois avec 350 μ L/puits de solution de lavage. De la peroxydase de raifort conjuguée à l'avidine a été ajoutée aux puits (100 μ L/puits). Ensuite, les puits ont été incubés 30 minutes à 37 °C afin de permettre la liaison entre la biotine et l'avidine. Après l'incubation, les puits ont été lavés trois fois avec 350 μ L/puits de solution de lavage et 90 μ L/puits de substrat tétraméthylbenzidine (TMB) ont été ajoutés aux puits. Les puits ont été incubés dix minutes à 37 °C à l'abri de la lumière pour favoriser la réaction du substrat TMB. La réaction a été arrêtée par l'ajout de 50 μ L/puits d'acide sulfurique. Le changement de couleur a été mesuré par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 450 ± 2 nm. La génération d'une courbe standard a permis de déterminer la concentration d'ApoB dans chaque puits.

3.4.4 Détermination de la réduction de cholestérol LDL/VLDL en circulation

La détermination de la réduction de cholestérol LDL/VLDL en circulation a permis d'évaluer l'effet de la réduction d'ApoB en circulation sur la formation des lipoprotéines athérogènes. Le

niveau de cholestérol LDL/VLDL en circulation a été déterminé par l'entremise d'un test quantitatif de détection colorimétrique EnzyChrom™ (EHDL-100, BioAssay Systems, Hayward, CA, USA) selon les instructions du fabricant. Brièvement, 20 µL de sérum ont été mélangés à 20 µL de réactif de précipitation dans un tube Eppendorf 1,5mL, puis le tube a été centrifugé pendant cinq minutes à 9500 ×g. La précipitation des LDL/VLDL est basée sur la méthode de précipitation au PEG, permettant de séparer les HDL des LDL/VLDL. Le culot de LDL/VLDL a été resuspendu dans 40 µL de PBS, puis 24 µL de cette solution ont été transférés dans un nouveau tube contenant 96 µL de tampon de test. Dans une plaque de 96 puits, 50 µL de la solution de LDL/VLDL, de standard et de blanc ont été ajoutés dans leur puits respectif. Les concentrations de cholestérol LDL/VLDL ont été déterminées en ajoutant 1 µL d'un mélange d'estérase cholestérol et de déshydrogénase cholestérol, ainsi que 18 µL de nicotinamide adénine dinucléotide (NAD). La réaction de réduction de la NAD en nicotinamide-adénine-dinucléotide-hydrogéné (NADH) possède une densité optique proportionnelle au cholestérol. Par conséquent, la détermination de la densité optique à 340 nm a permis d'évaluer la concentration de cholestérol LDL/VLDL en circulation.

3.4.5 Les analyses histologiques

Les analyses histologiques ont enrichi cette étude en donnant un aperçu des événements d'ordre athérogène et immunitaire qui ont eu lieu dans le foie lors de la thérapie par ARNi. Ce type d'analyse a permis d'avoir une idée des effets des nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN sur l'accumulation de lipides dans le foie et sur la santé du foie. L'analyse du foie est très importante puisque le foie est un organe vital où l'ApoB est sécrétée et où les nanoparticules s'accumulent en grand nombre. Les analyses ont été réalisées en double-aveugle sur les coupes histologiques des tissus hépatiques d'une seule souris par groupe.

3.4.5.1 L'enrobage du foie dans la paraffine

Les lobes droits de tous les foies récoltés ont été placés dans des cassettes en plastique. Les échantillons de foie ont été déshydratés dans des solutions d'éthanol (Commercial Alcohols, Boucherville, QC, Canada) (70 %-3 heures; 95 %-3 heures; 100 %-2 heures; 100 %-2 heures; 100 %-3 heures) et de xylène (X5-4, Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada) (I-1h; II-1h; III-2h)

de concentrations croissantes durant différentes périodes d'incubation. La déshydratation a été faite automatiquement par la machine Leica TP1020 (Leica, Concord, ON, Canada), totalisant 17 heures d'incubation. Les échantillons ont baigné dans une série de solutions de différents teneurs en paraffine durant une et deux heures (I-1 heure; II-1 heure; III-2 heures) pour permettre l'infiltration dans les organes. Ensuite, les cassettes ont été placées dans des moules en métal où de la paraffine liquide a été coulée en utilisant la machine Leica 1160 (Leica, Concord, ON, Canada). Les échantillons ont été réfrigérés durant au moins une heure de manière à solidifier la paraffine. Les échantillons de foie fixés dans la paraffine ont été entreposés à la température de la pièce. Les blocs de paraffine ont ensuite été tranchés en sections de 5 µm d'épaisseur et les sections ont été placées sur des lamelles de microscope.

3.4.5.2 L'accumulation de lipides dans le foie

L'athérosclérose est une maladie menant à l'accumulation de vacuoles de gras dans le foie aboutissant éventuellement à un foie gras (Carmiel-Haggai, Cederbaum, & Nieto, 2005). Par conséquent, l'étude de l'accumulation de lipides dans le foie a permis de déterminer si les injections de nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB ont eu un impact sur le développement d'un foie gras. Avant de débiter la coloration, les sections obtenues tel que décrit dans la section 3.4.5.1 ont été déparaffinées et réhydratées. L'accumulation de lipides a été observée par la coloration des coupes histologiques des tissus hépatiques par l'hématoxyline-éosine. Après un lavage dans l'eau courante, les sections ont été trempées de manière séquentielle dans l'hématoxyline de Harris (SH30-500D, Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada) durant quatre minutes. Ensuite, les sections ont été trempées trois fois dans l'eau courante et laissées durant 15 minutes dans l'eau de lavage pour être subséquentement trempées trois fois dans l'éthanol 1 % et submergées dans l'eau durant cinq minutes. Les sections ont été imbibées de LiCO₃ 1 % (L119-500, Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada), elles ont été lavées dans l'eau durant cinq minutes et elles ont été plongées dans trois bateaux contenant de l'éthanol 100 %, durant trois minutes pour chaque bateau. Les sections ont été imprégnées d'éosine (C145380, Surgipath, Eagle River, WI, USA) durant une minute et rincées dans trois bateaux consécutifs d'éthanol 100 % durant trois minutes pour chaque bateau. Les sections ont été déshydratées dans trois bateaux consécutifs de xylène durant trois minutes chacun. Après les multiples incubations,

les lamelles ont été montées avec du Permout (SP15-100, Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada). Les lamelles ont été observées à 40X avec un microscope Axiolab de Zeiss (Carl Zeiss Canada Ltd., Toronto, ON, Canada).

3.4.5.3 L'intégrité structurelle du foie

L'intégrité structurelle du foie a été étudiée afin de s'assurer que les nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB n'aient pas endommagé cet organe essentiel. Les sections obtenues tel que décrit dans la section 3.4.5.1 ont été déparaffinées et déshydratées avant d'amorcer les multiples étapes de coloration. Des coupes histologiques des tissus hépatiques déparaffinées de 5 µm placées sur des lamelles de microscope ont été colorées par du safranin-O/Fast-green/hématoxyline de fer afin de déterminer l'intégrité structurelle du foie suite au développement et au traitement de l'athérosclérose. D'abord les sections ont été trempées dans une solution d'hématoxyline de fer de Weigert (Composante A - HT107 et Composante B - HT109, Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, ON, Canada) durant huit minutes puis rincées dans l'eau courante pendant cinq minutes. Ensuite, elles ont été submergées dans une solution diluée d'hématoxyline de fer de Weigert Composante B et lavées à l'eau courante. Les sections ont baignées dans une solution de 0,04 % Fast Green FCF (S-7252—25G, Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, ON, Canada) durant une minute puis elles ont été trempées rapidement dans l'acide acétique 1 % et colorées dans une solution de 0,2 % de safranin-O (S-2255-25G, Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, ON, Canada) pendant quatre minutes. Les sections ont été déshydratées dans des solutions d'éthanol (I, II et III) et de xylène (I, II et III) durant trois minutes pour chaque solution. Enfin, les lamelles supportant les coupes histologiques des tissus hépatiques ont été montées avec du Permout et entreposées à température de la pièce. Le microscope Axiolab de Zeiss a été utilisé pour la prise d'images à 40X.

3.5 Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel Statistica 9.0 (STATSOFT; Statistica, Tulsa, OK, USA). Les données sont exprimées en tant que moyenne plus ou moins l'écart-type. Les tests statistiques employés pour déterminer si les résultats sont statistiquement significatifs sont le test d'analyse de la variance (ANOVA) à un facteur suivi du test post-hoc de Tuckey. Les

résultats sont considérés statistiquement significatifs ou très significatifs si la valeur-p est inférieure à 0,05 (*) ou inférieure à 0,01 (**), respectivement.

CHAPITRE 4 RÉSULTATS

4.1 Caractérisation physico-chimique des nanoparticules chitosane/ODNdb-ApoB

La caractérisation physico-chimique des nanoparticules chitosane/ODNdb-ApoB avait pour but de déterminer leur taille, leur forme et leur potentiel ζ . De plus, cette analyse a permis d'évaluer la formation et la stabilité des nanoparticules, ainsi que le niveau de protection qu'offre le chitosane aux ODNdb-ApoB dans les nanoparticules contre des nucléases. La caractérisation a contribué à la compréhension du comportement des nanoparticules chitosane/siARN-ApoB dans les études *in vitro* et *in vivo* subséquentes.

4.1.1 Détermination de la taille et du potentiel ζ des nanoparticules chitosane/ODNdb-ApoB

La taille et le potentiel ζ des nanoparticules chitosane/ODNdb-ApoB jouent un rôle important dans l'interaction des nanoparticules avec leur environnement. Par conséquent, la mesure de ces propriétés physico-chimiques est une étape cruciale de l'étude des nanoparticules chitosane/ODNdb-ApoB. Les résultats des analyses en DLS ont démontré que le diamètre hydrodynamique des nanoparticules chitosane/ODNdb-ApoB varie entre 41 et 108 nm, en considérant les écarts-types (Tableau 4.1). Le chitosane de MM plus élevée (80 kDa) a formé des nanoparticules possédant une taille supérieure. L'utilisation d'un ratio N:P (≥ 5) et d'un DD (≥ 80 %) élevés a mené à la formation de nanoparticules ayant un potentiel ζ plus élevé (Tableau 4.1). De plus, les faibles PDI suggèrent l'uniformité des populations de nanoparticules chitosane/ODNdb-ApoB.

Tableau 4.1: Taille³ (DLS et ESEM), potentiel ζ (DLS) et PDI (DLS) des nanoparticules chitosane/ODNdb-ApoB pour les formulations 92-10-5, 80-80-5 et 80-10-10.

ODNdb	Chitosane	Taille DLS par intensité (nm)	Taille ESEM (nm)	Potentiel ζ (mV)	PDI
ApoB	92-10-5	45 ± 4	66 ± 5	21 ± 2	$0,09 \pm 0,02$
ApoB	80-80-5	100 ± 8	75 ± 13	16 ± 1	$0,19 \pm 0,02$
ApoB	80-10-10	64 ± 6	67 ± 7	19 ± 2	$0,24 \pm 0,02$

4.1.2 Analyse des nanoparticules chitosane/ODNdb-ApoB par microscopie électronique à balayage environnemental

La caractérisation de la forme des nanoparticules chitosane/ODNdb-ApoB a été réalisée par microscopie électronique à balayage environnementale (ESEM). Cette analyse a montré que les nanoparticules ont une forme sphérique lorsque préparées avec les formulations de chitosane 92-10-5 (Figure 4-1A), 80-80-5 (Figure 4-1B) et 80-10-10 (Figure 4-1C). Les contrôles de chitosane seul pour chaque formulation n'ont fourni aucune information, car aucun agglomérat n'a été observé. Dans le but de confirmer les résultats des analyses en DLS, le diamètre des nanoparticules chitosane/ODNdb-ApoB ont été mesurées par l'entremise de l'ESEM. Similairement, une formulation de chitosane possédant une MM plus élevée (80 kDa) a permis la formation de nanoparticules chitosane/ODNdb-ApoB de plus grande taille (Tableau 4-1).

³ Le diamètre hydrodynamique des nanoparticules a été mesuré par DLS et le diamètre des nanoparticules a été mesuré par ESEM.

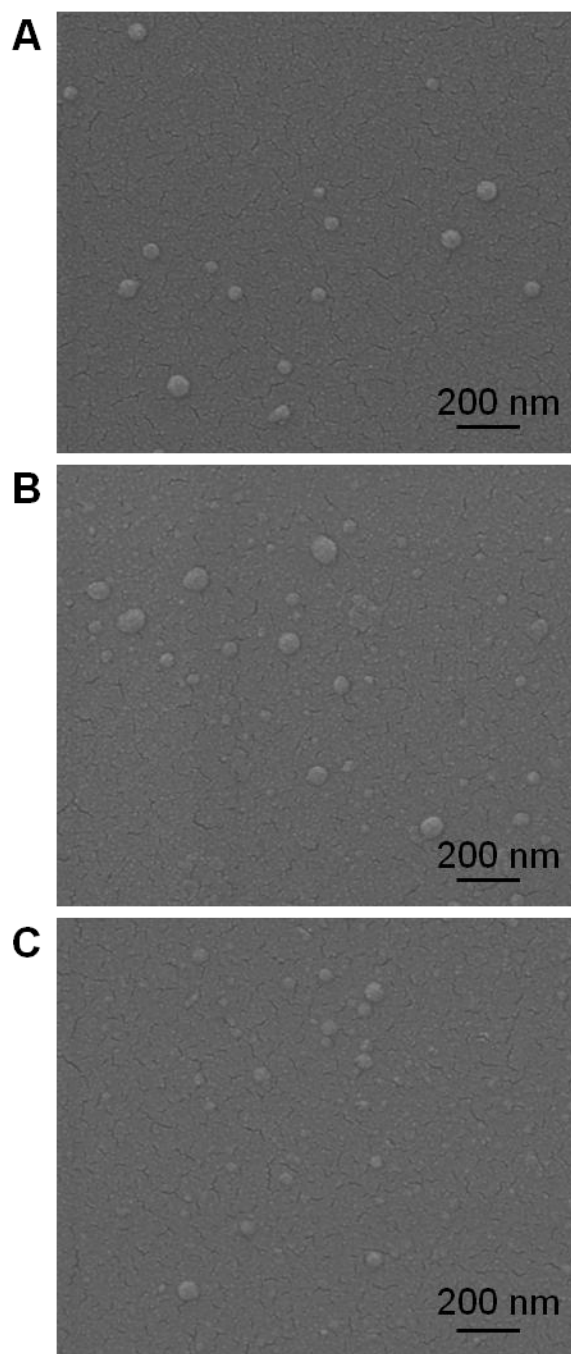


Figure 4-1: Images des nanoparticules chitosane/ODNdb-ApoB sphériques prises à un grossissement de 80,000X avec l'ESEM en mode vide élevé (*high vacuum mode*), pour les formulations de chitosane 92-10-5 (A), 80-80-5 (B) et 80-10-10 (C).

4.1.3 Analyse de la formation et de la stabilité des nanoparticules chitosane/ODNdb-ApoB

Cette expérience a eu pour but de déterminer la stabilité des nanoparticules chitosane/ODNdb-ApoB à différents pH et à des intervalles de temps différents suivant leur formation. L'étude du relargage des ODNdb-ApoB permet de prédire en partie la préservation de la stabilité des nanoparticules chitosane/ODNdb-ApoB, *in vivo*, dans un modèle animal. La formation et la stabilité des nanoparticules chitosane/ODNdb-ApoB pour les formulations 92-10 (Figure 4-2), 80-80 (Figure 4-3) et 80-10 (Figure 4-4) (ratios N:P 0, 0,5, 5 et 10) ont été évaluées durant différentes périodes (0,5, 4 et 20 heures) d'incubation dans des solutions de pH distincts (pH 6,5, 7 et 8). Les nanoparticules formées à un ratio N:P supérieur ou égal à 5 et incubées dans une solution de pH légèrement acide (pH 6,5) ont demeuré stables durant 20 heures, indépendamment du DD et de la MM (Figure 4-2A, 4-3A et 4-4A). Sachant que le pK_a du chitosane est de 6,5, il est logique d'observer une stabilité supérieure pour les nanoparticules formées dans une solution à pH 6,5. À pH neutre (pH 7), la stabilité des nanoparticules formées à un ratio N:P supérieur ou égal à 5 a été amoindrie après 20 heures d'incubation vu la migration ralentie des ODNdb-ApoB (Figure 4-2B, 4-3B et 4-4B). Ce phénomène a eu lieu à cause des ODNdb-ApoB encore lié à des sites cationiques présents sur les chaînes de chitosane, ralentissant ainsi la migration des ODNdb-ApoB. À pH 7, les nanoparticules ont été déstabilisées, mais pas assez pour relarguer tous les ODNdb-ApoB. Le ralentissement de la migration d'ODNdb-ApoB a aussi eu lieu pour les nanoparticules formées à un ratio N:P de 0,5 incubées durant 0,5 et 4 heures. Les nanoparticules formées à pH basique (pH 8) ont présenté une stabilité nettement inférieure aux nanoparticules formées à pH 6,5 et 7. Après 20 heures d'incubation à pH 8, les nanoparticules formées de chitosane 92-10-10 ont présenté une stabilité supérieure à celle des nanoparticules formées de chitosane 80-80-10 et 80-10-10 (Figure 4-2C, 4-3C et 4-4C). L'utilisation d'un ratio N:P de 10 a permis d'augmenter la stabilité des nanoparticules comparativement au ratio N:P de 5. Parmi les trois formulations utilisées, la formulation 92-10 a mené à la formation des nanoparticules les plus stables, indépendamment du pH d'incubation et des ratios N:P utilisés. Tous les gels ont inclus la migration d'une échelle de poids moléculaire de dix paires de bases (Figure 4-2, 4-3 et 4-4).

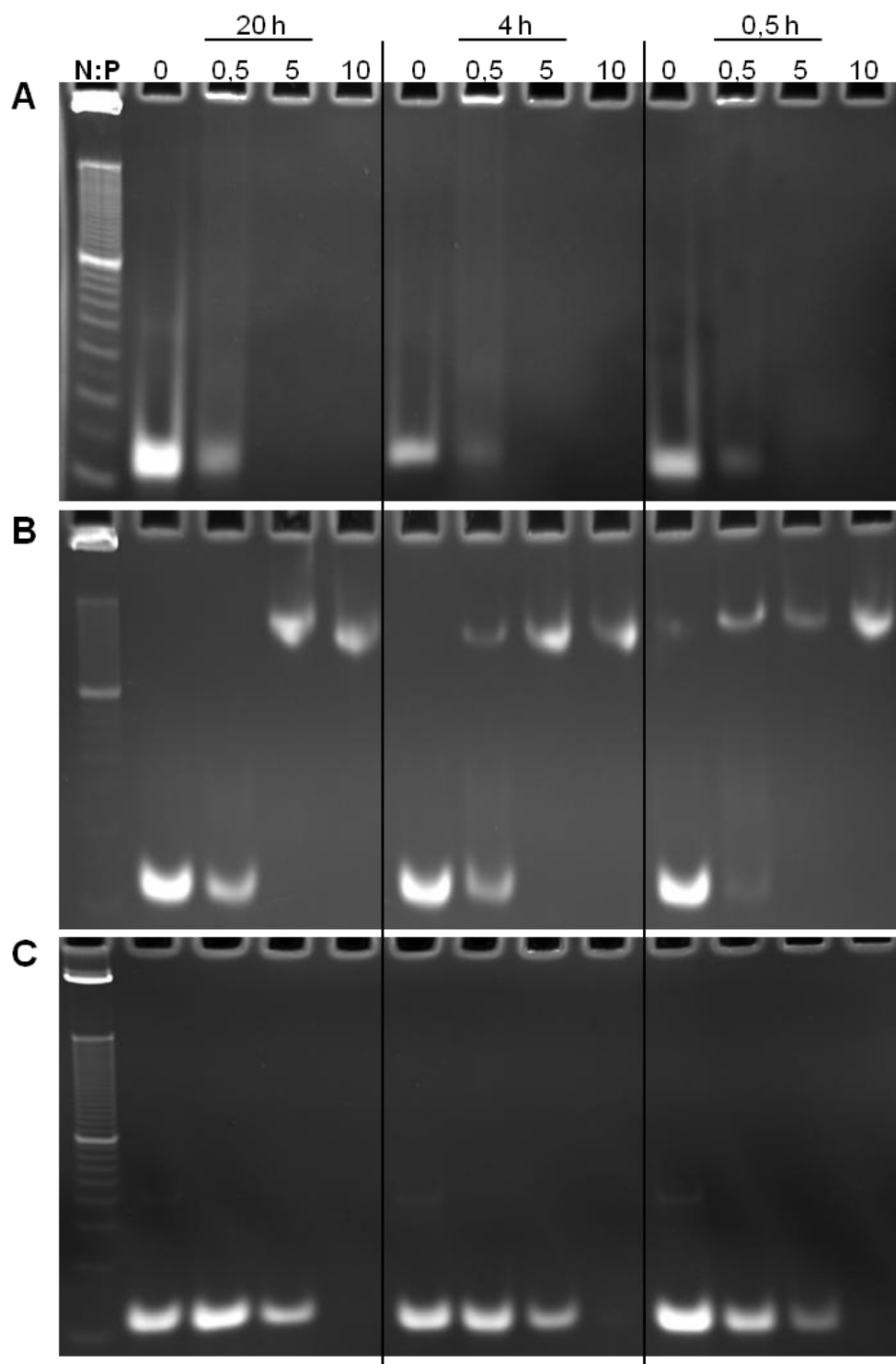


Figure 4-2: Migration d'ODNdb-ApoB par PAGE démontrant la stabilité des nanoparticules chitosane (92-10-5)/ODNdb-ApoB incubées à pH 6,5, 7 et 8 pendant 0,5, 4 et 20 heures.

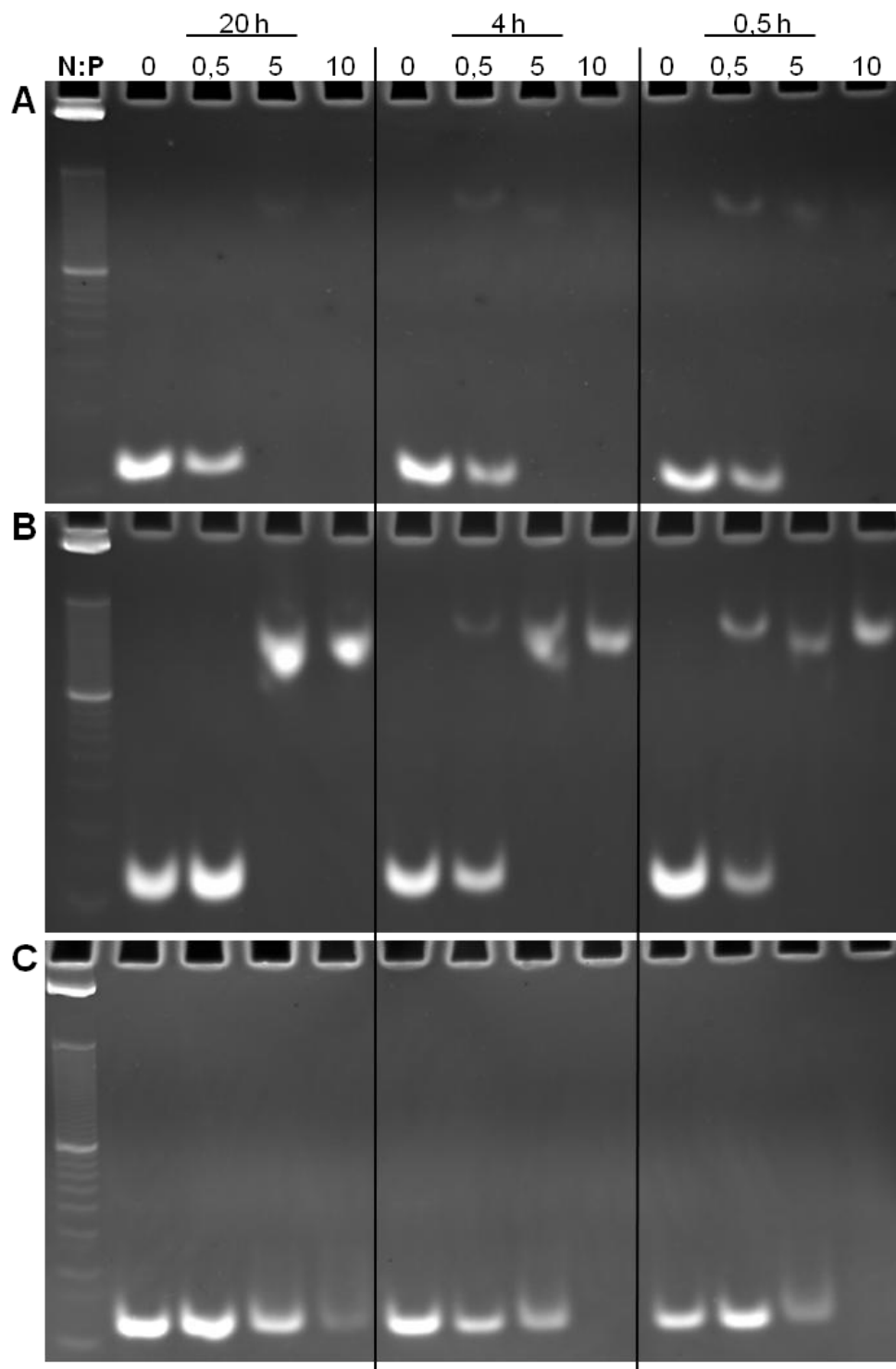


Figure 4-3: Migration d'ODNdb-ApoB par PAGE démontrant la stabilité des nanoparticules chitosane (80-80-5)/ODNdb-ApoB incubées à pH 6,5, 7 et 8 pendant 0,5, 4 et 20 heures.

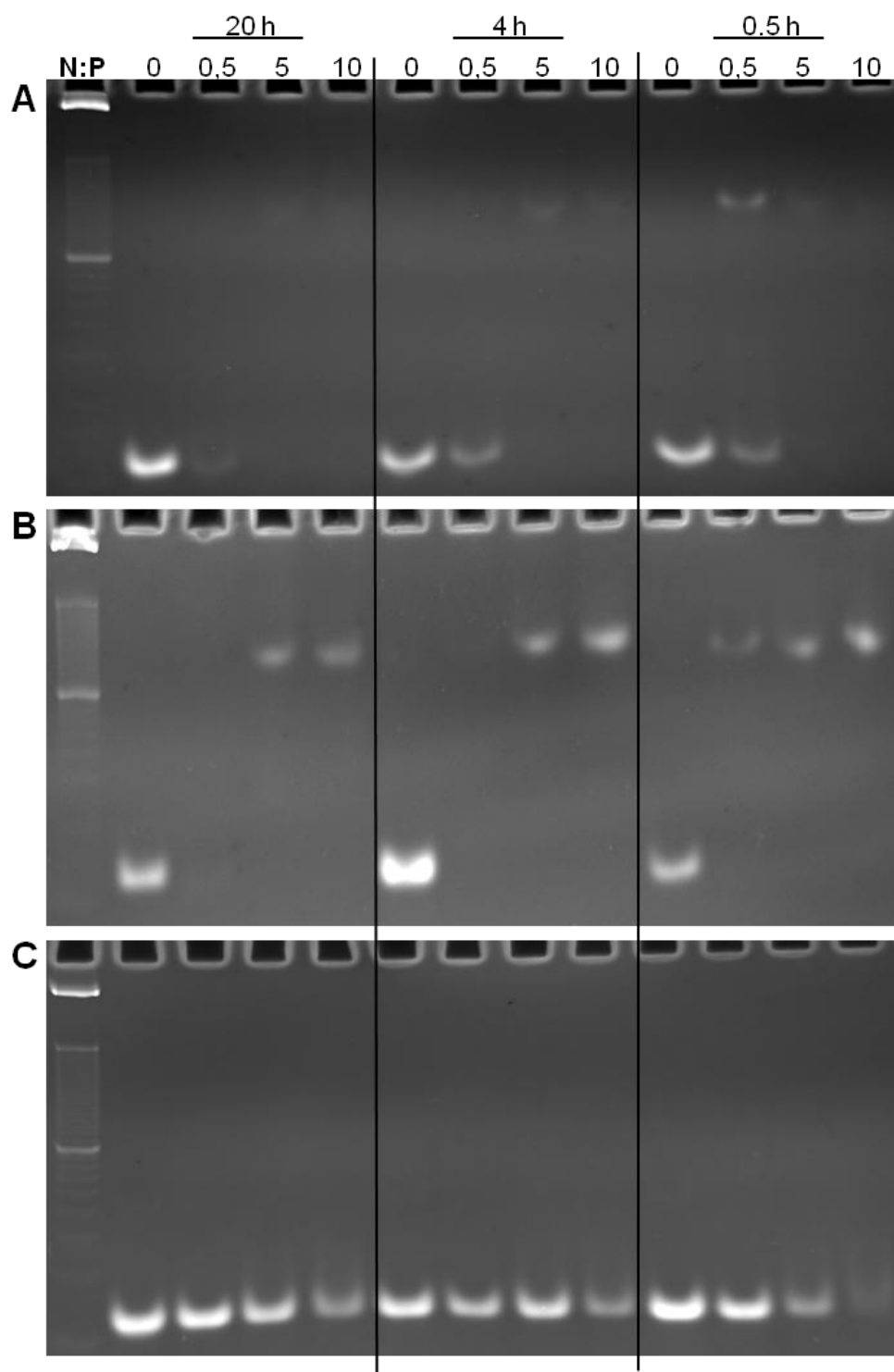


Figure 4-4: Migration d'ODNdb-ApoB par PAGE démontrant la stabilité des nanoparticules chitosane (80-10-10)/ODNdb-ApoB incubées à pH 6,5, 7 et 8 pendant 0,5, 4 et 20 heures.

4.1.4 Étude de la protection, par le chitosane, des ODNdb-ApoB dans les nanoparticules contre la digestion par les nucléases.

Le test de protection d'ODNdb-ApoB contre l'ADNase I a permis de déterminer l'efficacité de protection des différentes formulations de chitosane contre des nucléases. Les quantités relatives d'ODNdb-ApoB migrés ont été calculées en fonction de l'échantillon non-traité à l'ADNase I spécifique à chaque formulation de chitosane (0 unité ADNase I; Figure 4-5). Les formulations de chitosane 92-10-5, 80-80-5 et 80-10-10 ont efficacement protégé les ODNdb-ApoB contre des concentrations d'ADNase I inférieures ou égales à 2 unités d'ADNase I/ μ g d'ODNdb (Figure 4-5). La formulation de chitosane 80-80-5 a été en mesure de protéger approximativement 60 % des ODNdb-ApoB complexés suite à la digestion faite par 2 unités d'ADNase I/ μ g d'ODNdb. Les formulations de chitosane 92-10-5 et 80-10-10 ont présenté un profil de protection similaire à la formulation 80-80-5 et elles ont protégé 20 % de l'ODNdb-ApoB complexés suite à la digestion faite par 2 unités d'ADNase I/ μ g d'ODNdb (Figure 4-5). Le contrôle C1 correspond à la migration d'ODNdb-ApoB seuls (non-complexés au chitosane) et non-traités à l'ADNase I ou à la chitosanase (Figure 4-5). Le contrôle C2 représente la migration d'ODNdb-ApoB seuls (non-complexés au chitosane) et non-traités à l'ADNase I, mais traités à la chitosanase (Figure 4-5). Le contrôle C3 a démontré que 0,5 unité d'ADNase I/ μ g d'ODNdb-ApoB a suffi pour digérer la totalité des ODNdb-ApoB seuls (non-complexés au chitosane) (Figure 4-5).

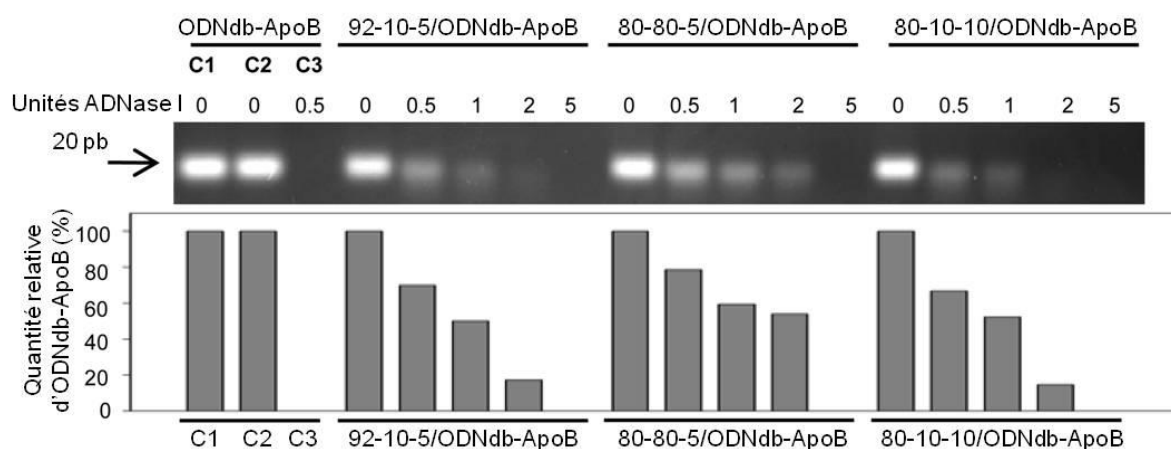


Figure 4-5: Migration d'ODNdb-ApoB sur gel d'agarose de 5 % et quantification de l'ODNdb-ApoB migrés représentant le niveau de protection offert par les formulations de chitosane 92-10-5, 80-80-5 et 80-10-10 contre différentes concentrations d'ADNase I.

4.2 Étude *in vitro*

L'étude *in vitro* avait pour but d'évaluer l'efficacité d'internalisation des nanoparticules chitosane/ODNdb-ApoB dans différentes lignées cellulaires (HepG2, HEK293, RAW264.7), ainsi que leur comportement à l'intérieur des cellules. De plus, le silençage génique de l'ApoB induit par les nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB a été évalué dans des cellules hépatiques HepG2. L'étude *in vitro* est essentielle pour comprendre l'efficacité des nanoparticules chitosane/siARN-ApoB dans un milieu contrôlé et pour poursuivre la recherche dans un modèle *in vivo*.

4.2.1 Étude de l'internalisation des nanoparticules chitosane/ODNdb-ApoB par cytométrie en flux et microscopie confocale

4.2.1.1 Analyse par cytométrie en flux

L'étude de l'internalisation des nanoparticules chitosane/ODNdb-ApoB a permis d'évaluer, après 24 heures d'incubation, l'efficacité des nanoparticules à transfecter différentes lignées cellulaires. L'analyse par cytométrie en flux a démontré que les nanoparticules formées de chitosane 92-10-5 ont été les plus efficaces pour la transfection des lignées cellulaires HepG2, HEK293 et

RAW264.7 (Figure 4-6). En fait, cette formulation a permis d'atteindre un niveau d'efficacité de transfection se situant entre 55 et 86 %. Les nanoparticules chitosane/ODNdb-ApoB ont atteint des niveaux de transfection comparables aux nanoparticules formées de DharmaFECT™1 dans les lignées cellulaires HepG2. Par contre, les nanoparticules formées de chitosane 92-10-5 ont eu une efficacité de transfection statistiquement supérieure au contrôle positif DharmaFECT™1 dans les lignées HEK293 et RAW264.7.

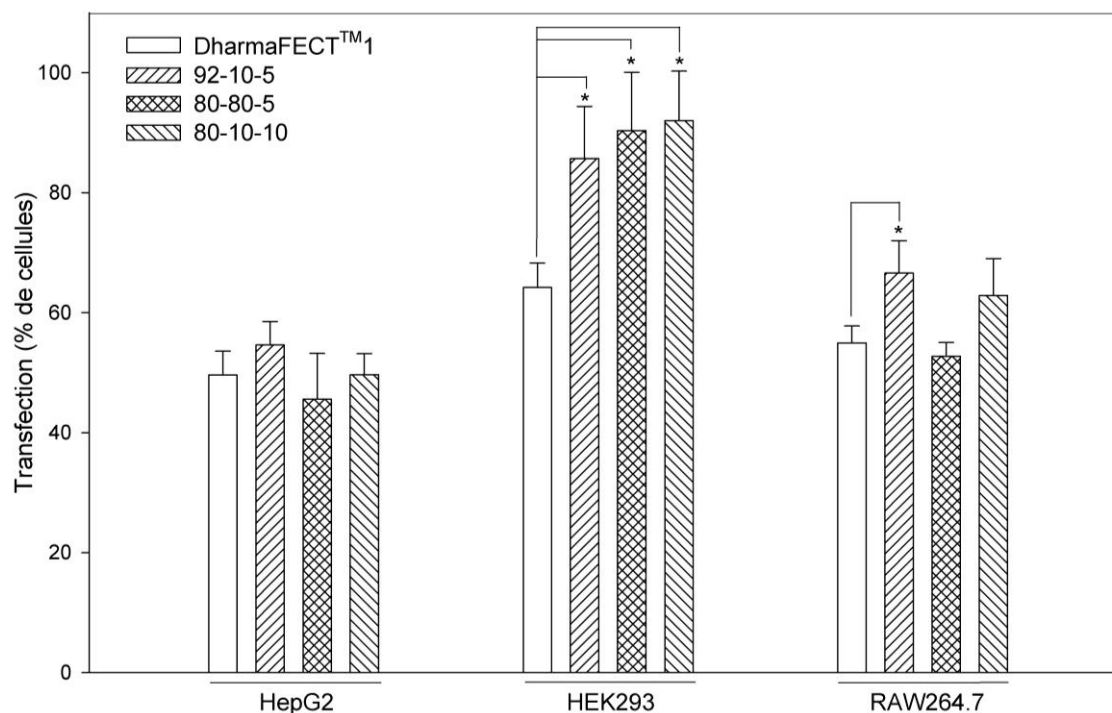


Figure 4-6: Évaluation par cytométrie en flux du niveau de transfection cellulaire atteint par les nanoparticules chitosane/ODNdb-ApoB dans les lignées cellulaires HepG2, HEK293 et RAW264.7, pour les formulations de chitosane 92-10-5, 80-80-5 et 80-10-10. (n=3, $p^* < 0,05$)

4.2.1.2 Analyse par microscopie confocale

L'internalisation cellulaire des nanoparticules chitosane/ODNdb-ApoB, leur libération endolysosomale et le relargage des ODNdb-ApoB dans les cellules HepG2, HEK293 et Raw294.7 ont été étudiés par microscopie confocale, 24 heures après la transfection des cellules. Les nanoparticules, formées d'ODNdb-ApoB marqués au 5' 6-FAM (en vert) et de chitosane (92-10-5) marqué à la rhodamine (en rouge), ont été utilisées pour transfecter les cellules HepG2

(Figure 4-7), HEK293 (Figure 4-8) et RAW264.7 (Figure 4-9). Les nanoparticules chitosane (92-10-5)/ODNdb-ApoB ont été identifiées par colocalisation, c'est-à-dire par les signaux de couleurs jaunes résultant de la superposition des signaux verts des ODNdb-ApoB et des signaux rouges du chitosane. Ainsi, la faible quantité de colocalisation dans les cellules suggère que les nanoparticules ont été internalisées et que les ODNdb-ApoB ont été libérés efficacement 24 heures après la transfection. Plus spécifiquement, les points verts très diffus présents dans les cellules correspondent aux ODNdb-ApoB se retrouvant dans le cytoplasme après avoir été libérés des endolysosomes et du chitosane (flèches normales, Figure 4-7, 4-8 et 4-9). Les points verts de forte intensité correspondent vraisemblablement aux ODNdb-ApoB libérés du chitosane mais encore présents dans les endolysosomes (flèches pointillées, Figure 4-7, 4-8 et 4-9). Les nanoparticules chitosane (92-10-5)/ODNdb-ApoB ont franchi deux barrières biologiques, soit la membrane des cellules et les endolysosomes, une étape capitale pour effectuer le silençage génique de l'ApoB (Figure 4-7, 4-8 et 4-9). Ainsi, les résultats observés en microscopie confocale supportent ceux obtenus en cytométrie en flux démontrant la capacité des nanoparticules chitosane (92-10-5)/ODNdb-ApoB à transfecter différentes lignées cellulaires.

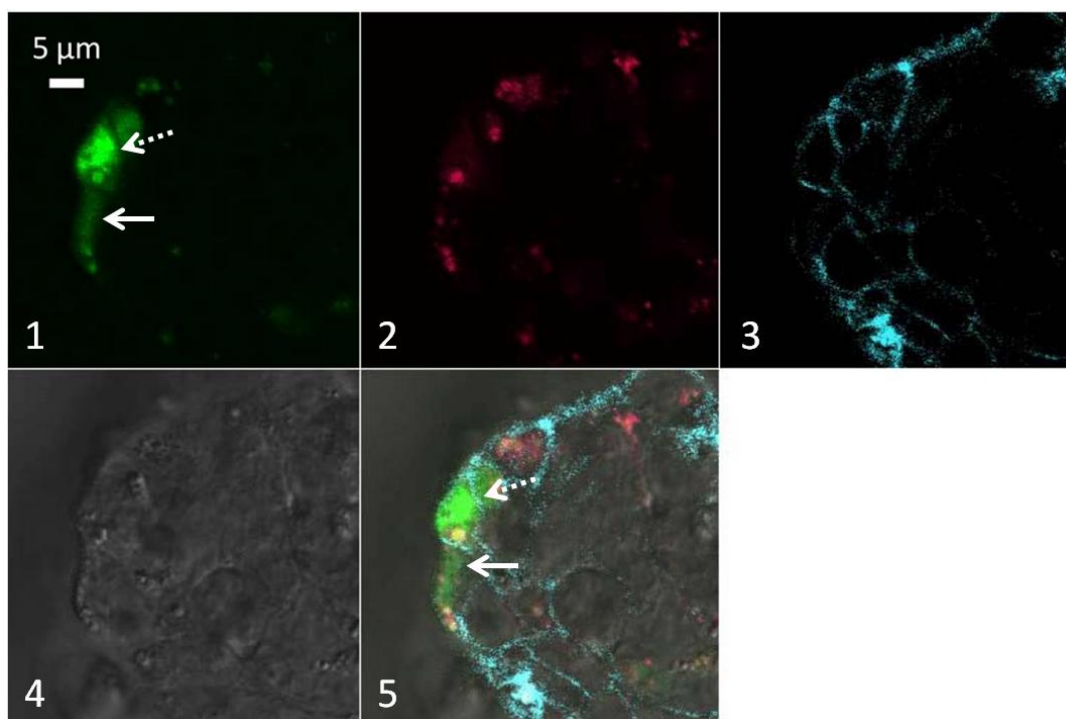


Figure 4-7: Détection des 5' 6-FAM-ODNdb-ApoB (vert; 1), du rhodamine-chitosane (rouge; 2), des membranes des cellules (bleu; 3), des cellules sans détection de fluorochromes (4) et de la superposition de tous les signaux (5) par microscopie confocale montrant le trafic extra et intracellulaire des nanoparticules chitosane (92-10-5)/ODNdb-ApoB (jaune) pour les cellules HepG2. (Flèche normale : ODNdb-ApoB dans le cytoplasme; flèche pointillée: ODNdb-ApoB dans les endolysosomes)

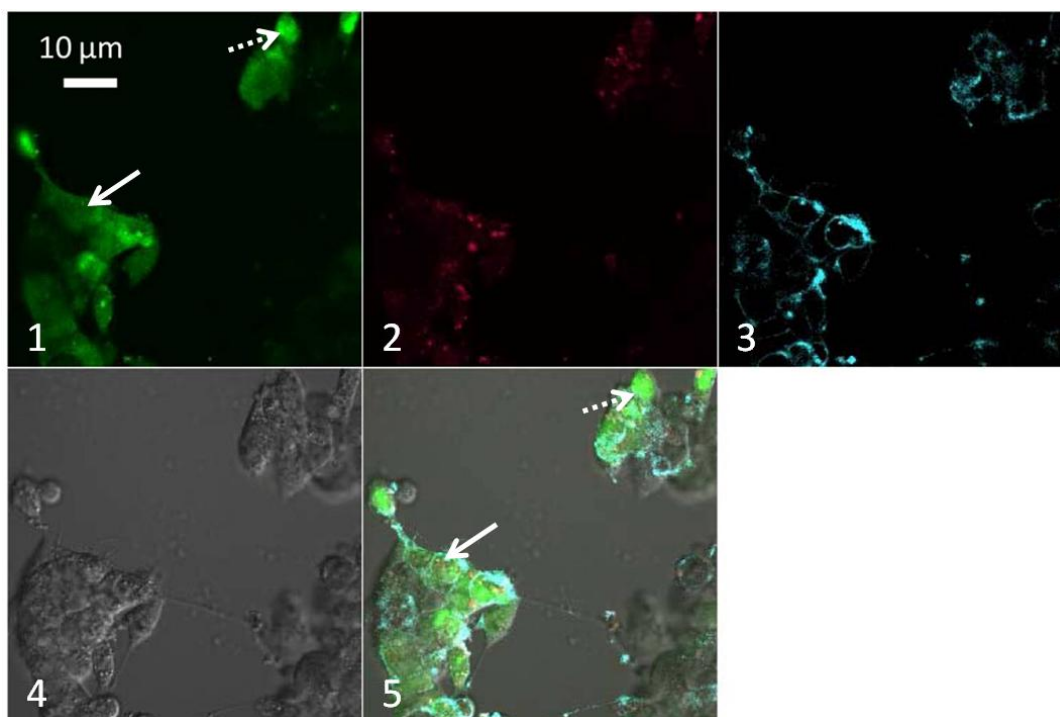


Figure 4-8: Détection des 5' 6-FAM-ODNdb-ApoB (vert; 1), du rhodamine-chitosane (rouge; 2), des membranes des cellules (bleu; 3), des cellules sans détection de fluorochromes (4) et de la superposition de tous les signaux (5) par microscopie confocale montrant le trafic extra et intracellulaire des nanoparticules chitosane (92-10-5)/ODNdb-ApoB (jaune) pour les cellules HEK293. (Flèche normale : ODNdb-ApoB dans le cytoplasme; flèche pointillée : ODNdb-ApoB dans les endolysosomes)

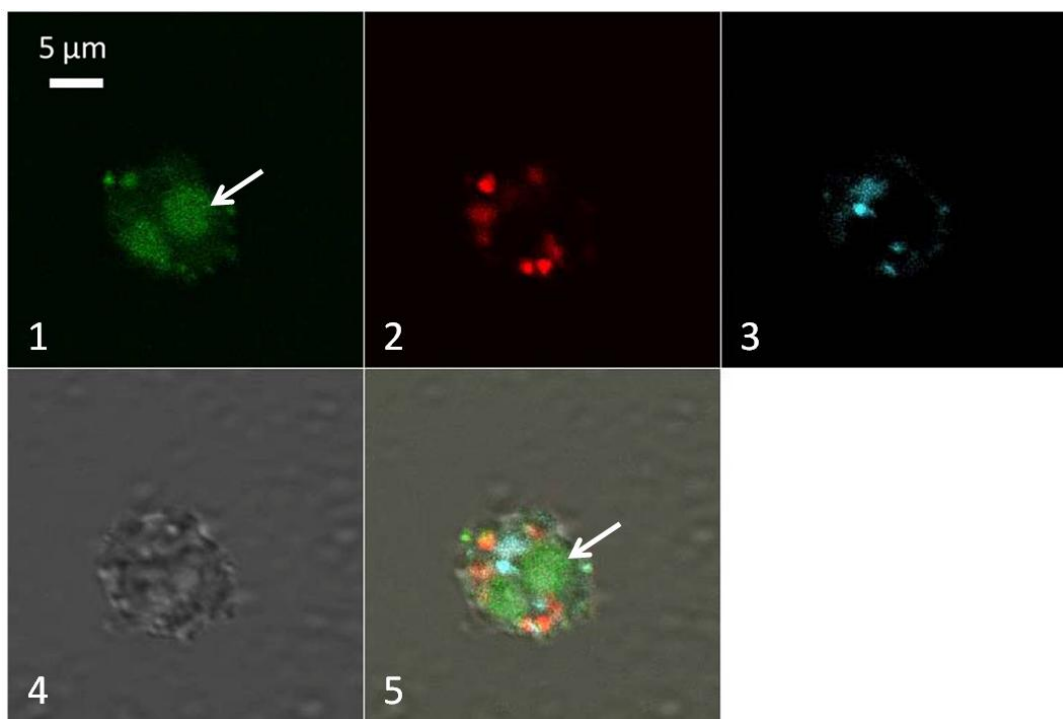


Figure 4-9: Détection des 5' 6-FAM-ODNdb-ApoB (vert; 1), du rhodamine-chitosane (rouge; 2), des membranes des cellules (bleu; 3), des cellules sans détection de fluorochromes (4) et de la superposition de tous les signaux (5) par microscopie confocale montrant le trafic extra et intracellulaire des nanoparticules chitosane (92-10-5)/ODNdb-ApoB (jaune) pour les RAW264.7. (Flèche normale : ODNdb-ApoB dans le cytoplasme; flèche pointillée : ODNdb-ApoB dans les endolysosomes)

4.2.2 Quantification relative du niveau d'expression de l'ARNm codant pour l'ApoB par qRT-PCR

La caractérisation physico-chimique a suggéré que les nanoparticules chitosane/ODNdb-ApoB, mimant les nanoparticules chitosane/siARN-ApoB, possèdent des caractéristiques physico-chimiques idéales pour la thérapie par ARNi. De plus, l'étude d'internalisation de la section 4.2.1 a démontré que les nanoparticules chitosane/ODNdb-ApoB pourraient être considérées comme système de livraison de siARN-ApoB, étant donné leur capacité à internaliser les cellules, à se libérer des endolysosomes et à se décomplexer de manière à libérer les acides nucléiques.

Le but de cette expérience était de mesurer le silençage génique de l'ApoB induit par les nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB dans les cellules HepG2 en quantifiant l'expression de l'ARNm codant pour l'ApoB par qRT-PCR. D'après les expériences en qRT-PCR, les nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB ont mené à l'inhibition d'approximativement 50 % de l'expression de l'ARNm ApoB, 24 heures après la transfection des cellules HepG2 (Figure 4-10). La différence entre ce niveau de silençage et celui obtenu en transfectant les cellules HepG2 avec les nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN leurs est statistiquement très significative. Cette différence a mis en évidence la spécificité des séquences de siARN-ApoB utilisées dans les expérimentations. De plus, les expériences par qRT-PCR (Figure 4-10) ont confirmé l'efficacité de transfection des nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB analysée par cytométrie en flux (Figure 4-6), spécifiquement pour les cellules HepG2. L'induction du silençage génique de l'ApoB dans les cellules HepG2 (Figure 4-10) signifie que les nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB ont été en mesure de se libérer des endolysosomes efficacement, tel qu'observé en microscopie confocale (Figure 4-7). L'utilisation des lipoplexes DharmaFECTTM1/siARN-ApoB a mené à une diminution de l'expression génique de l'ARNm ApoB plus importante que les nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB, 24 heures après la transfection.

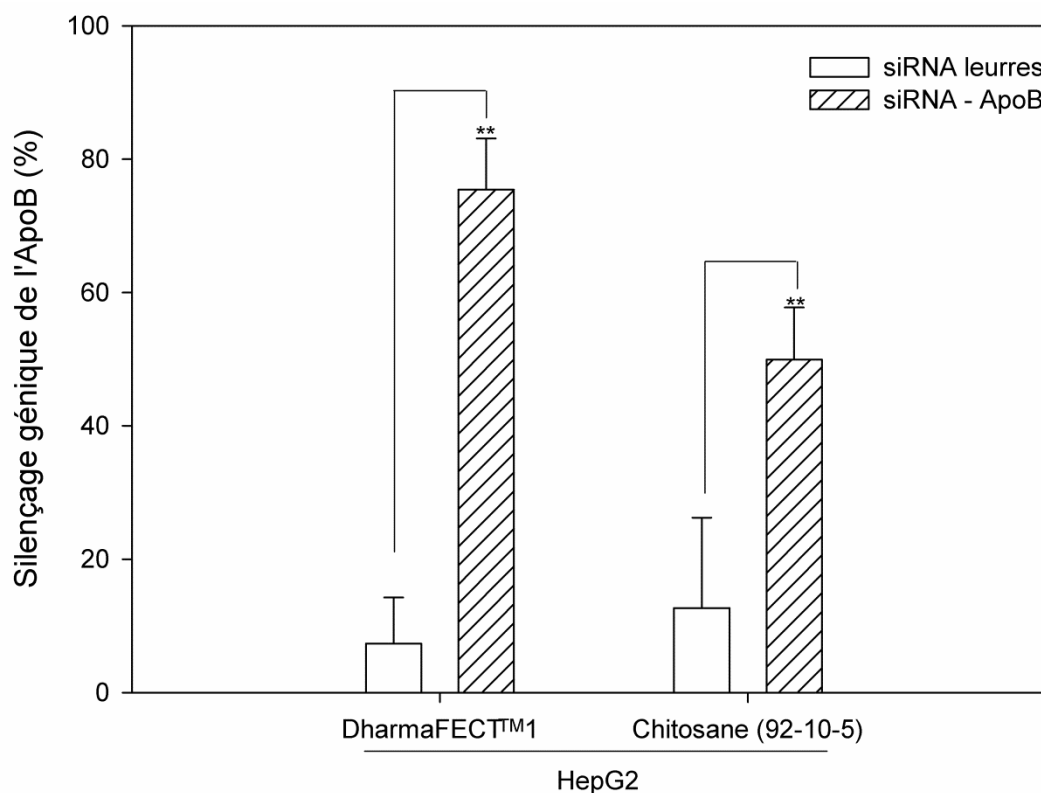


Figure 4-10: Niveaux du silençage génique de l'ApoB mesuré par qRT-PCR dans les cellules HepG2 traitées avec les nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB. (n=3; p** < 0,01)

4.3 Étude *in vivo* chez les souris C57BL/6

L'étude *in vivo* a permis de déterminer les effets phénotypiques induits suite à l'administration par voie intraveineuse de nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB à différents stades du développement athérosclérotique des souris C57BL/6. Des effets phénotypiques touchant l'évolution du poids des souris et les niveaux d'ApoB et de cholestérol LDL/VLDL en circulation ont été étudiés. Les profils biochimiques d'une souris athérosclérotique traitée et d'une souris athérosclérotique non-traitée a permis d'avoir une idée de l'effet des nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB sur les fonctions hépatiques des souris traitées. Des analyses histologiques sur le foie des souris ont été faites afin d'avoir une idée de l'effet des nanoparticules sur intégrité structurelle du foie et sur la stéatose liée à l'athérosclérose. L'étude *in vivo* entreprise dans cette recherche correspond à une preuve de concept mettant en évidence le

potentiel des nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB comme système de thérapie par ARNi visant l'athérosclérose.

4.3.1 Évolution du poids durant l'expérimentation

Le suivi du poids des animaux a permis de constater l'efficacité de la diète riche en gras employée pour favoriser le développement athérosclérotique et il a permis d'observer l'effet des injections de nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB sur l'évolution du poids des animaux. D'après les pesées hebdomadaires des animaux, la diète grasse a mené à l'augmentation accélérée du poids des souris de tous les groupes. La diète normale a mené à une légère augmentation du poids des souris du groupe contrôle « santé » (groupe D μ) (Figure 4-11). Les souris des groupes C4, C5 et le groupe recevant les siARN-ApoB seulement (groupe D β) ont eu une stabilisation dans le gain de masse corporelle hebdomadaire suite à leur première injection (Figure 4-11). Plus précisément, le poids des souris des groupes C4 et D β a été stable de la semaine du 21-12-2010 jusqu'à la semaine du 28-12-2010, tandis que le poids des souris du groupe C5 a été stable de la semaine du 28-12-2010 jusqu'à la semaine du 04-01-2011 (Figure 4-11). Cependant, lors des deuxième et troisième injections les souris ont continué à prendre du poids. Pour les souris des groupes C4, C5 et D β , les masses de siARN-ApoB administrés à la première et à la deuxième injection sont les mêmes étant donné la stabilisation du poids des souris suite à leur première injection (Figure 3-1). La stabilisation du poids des souris suite à la première injection n'a pas pu être démontrée pour les groupes C1-C3. Il est probable que la croissance importante des souris des groupes C1-C3 durant les premières semaines ait pu masquer la stabilisation de leur poids suite à leur première injection. Le poids moyen de chaque groupe de souris au moment de chaque injection peut être déterminé en divisant la masse moyenne de siARN-ApoB injectés (Figure 3-1) par la dose de 1 mg/kg ([=] 1 μ g/g) administrée aux souris.

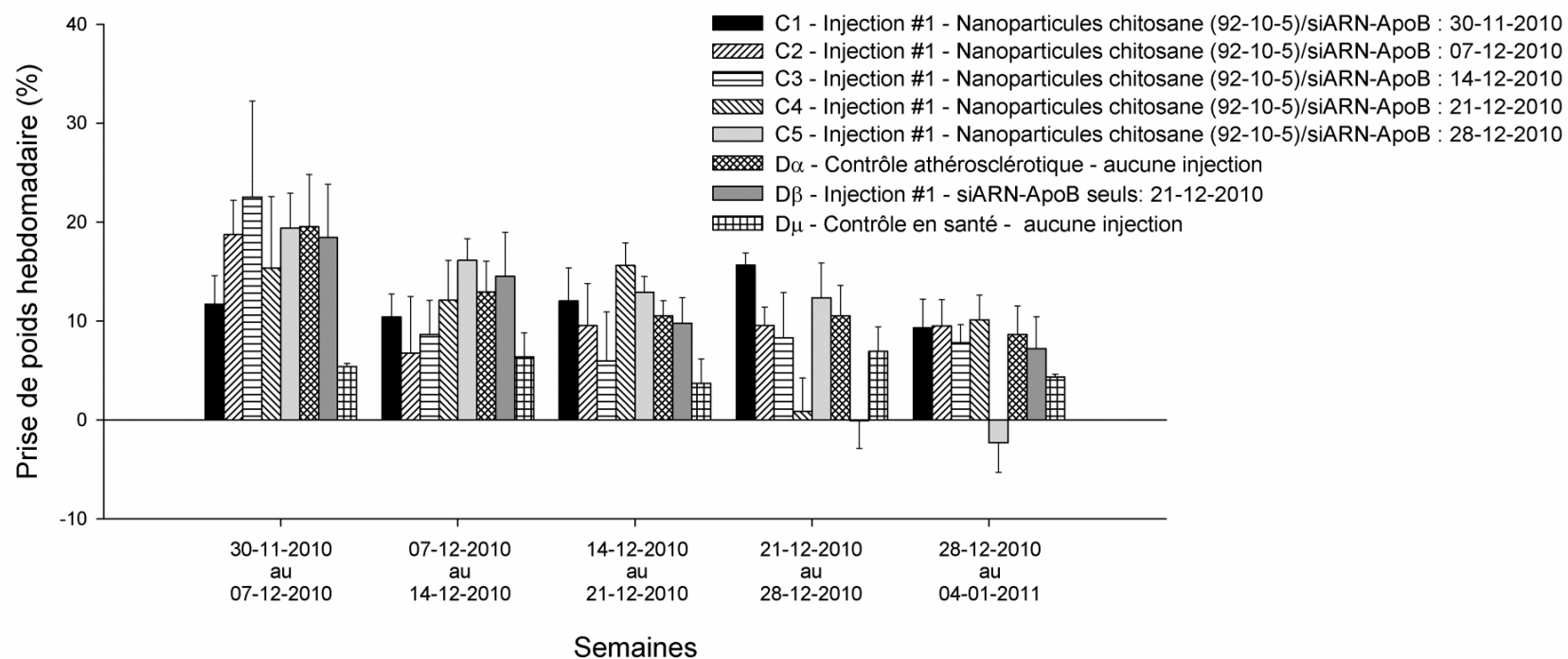


Figure 4-11: Prise de poids hebdomadaires des souris des groupes C1-C5 et des souris des groupes contrôles D α , D β et D μ et mise en évidence de la stabilisation du poids des souris des groupes C4, D β (21-12-2010 au 28-12-2010), C5 (28-12-2010 au 04-01-2011) après leur première injection. (n=4, à l'exception du groupe C1; n=3)

4.3.2 Détermination de la réduction d'ApoB en circulation

La détermination de la réduction du niveau d'ApoB en circulation a permis d'évaluer l'efficacité thérapeutique des nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB, puisque la réduction du niveau d'ApoB en circulation indique un ralentissement ou un arrêt du développement athérosclérotique. Le niveau d'ApoB en circulation dans le sérum des souris au moment de l'euthanasie a été déterminé par des tests ELISA en sandwich commerciaux (Figure 4-12). Les souris ayant reçu au moins une injection de nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB (groupes C1-C6) ont subi une baisse d'approximativement 30 % de leur concentration sanguine d'ApoB relativement au groupe athérosclérotique non-traité (groupe D α) (Figure 4-12). La diminution de 30 % a permis l'atteinte de niveaux « santé » d'ApoB en circulation comparables à ceux des souris « santé » non-athérosclérotiques (groupe D μ) (Figure 4-12). De plus, l'administration de nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB a permis de stabiliser le niveau d'ApoB en circulation durant au moins six semaines après la dernière injection, tel que démontré par le groupe C1 (Figure 4-12). Deux jours après une seule injection, le niveau d'ApoB en circulation des souris du groupe C6 a été réduit à un niveau comparable à celui obtenu par le groupe de souris non-athérosclérotiques (groupe D μ) (Figure 4-12). Le groupe de souris injectées avec les siARN-ApoB seuls (groupe D β) a aussi présenté une concentration d'ApoB en circulation réduite. Les souris du groupe D β ont conservé un niveau « santé » d'ApoB durant trois semaines, similairement aux souris du groupe C4 ayant reçu des injections de nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB (Figure 4-12). La réduction de la sécrétion d'ApoB indique une baisse de l'expression de l'ARNm ApoB.

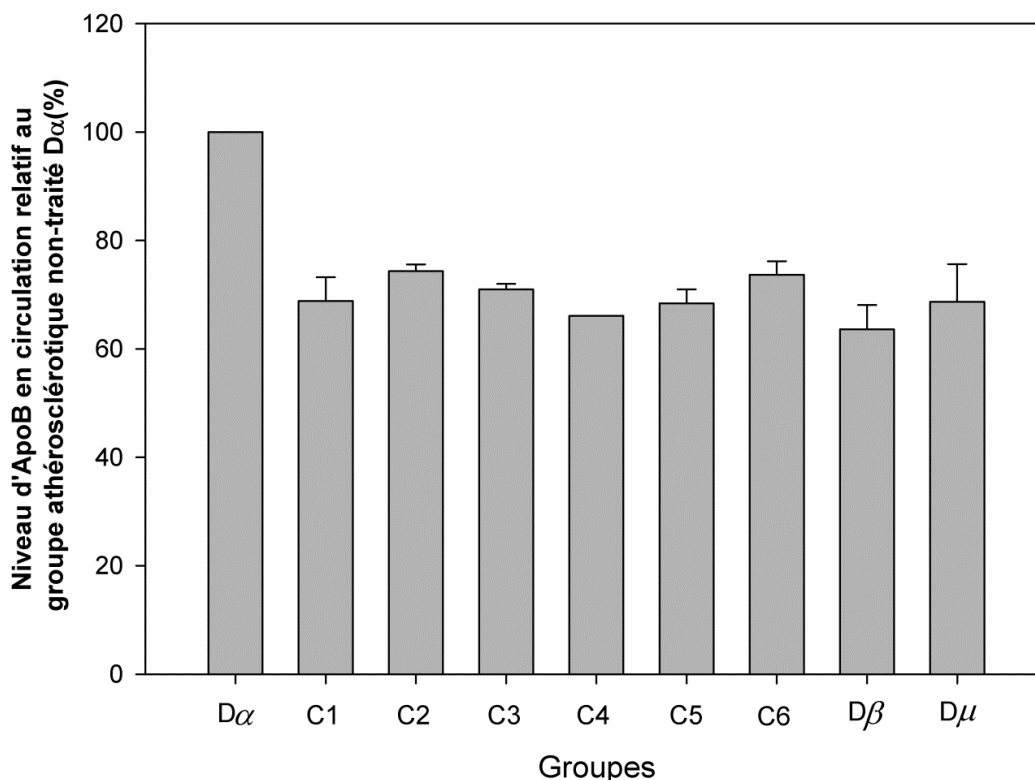


Figure 4-12: Détermination du niveau d'ApoB en circulation au jour de l'euthanasie par ELISA en sandwich pour tous les groupes traités (C1-C6) et groupes contrôles (Dα, Dβ et Dμ) relativement au groupe athérosclérotique non-traité (Dα). (n=4, à l'exception du groupe C1; n=3)

4.3.3 Détermination de la réduction de cholestérol LDL/VLDL en circulation

Sachant que le niveau d'ApoB en circulation a été réduit suite au traitement pour tous les groupes recevant des nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB, il est important de déterminer si cette réduction s'est reflétée sur le niveau de cholestérol LDL/VLDL en circulation. Les tests quantitatifs de détection colorimétrique ont démontré une réduction du niveau de cholestérol LDL/VLDL en circulation d'approximativement 20 % pour les souris des groupes traités (groupe C1-C6; excepté C5), relativement au groupe athérosclérotique non-traité (groupe Dα) (Figure 4-13). Toutefois, les souris du groupe C5 ont possédé un niveau de cholestérol LDL/VLDL en circulation significativement plus élevé que les souris de tous les groupes, ce qui suggère un artefact dû à l'expérience ou aux échantillons de sérum analysés (Figure 4-13). Les souris du groupe C6 ont atteint un niveau de cholestérol LDL/VLDL en circulation comparable à ceux des

souris des autres groupes traités (groupe C1-C4), malgré le fait que les échantillons de sérum du groupe C6 ont été prélevés deux jours après une seule injection de nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB (Figure 4-13). La réduction de 20 % n'a pas permis l'atteinte de niveaux de cholestérol LDL/VLDL comparables à ceux des souris non-athérosclérotiques (groupe D μ) (Figure 4-13). Par contre, le niveau de cholestérol LDL/VLDL mesuré a pu inclure le cholestérol transporté par les LDL/VLDL sécrétées avant le début de la thérapie, biaisant ainsi le niveau de cholestérol LDL/VLDL en circulation. De plus, la grande quantité de cholestérol transportée par les dérivés de VLDL contenant l'ApoE a pu contribuer à l'augmentation du niveau de cholestérol LDL/VLDL mesuré chez les groupes traités (groupe C1-C6). De plus, les souris recevant des injections de siARN-ApoB seuls (groupe D β) ont subi une réduction du niveau de cholestérol LDL/VLDL en circulation comparable à celle des souris recevant des injections de nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB (Figure 4-13).

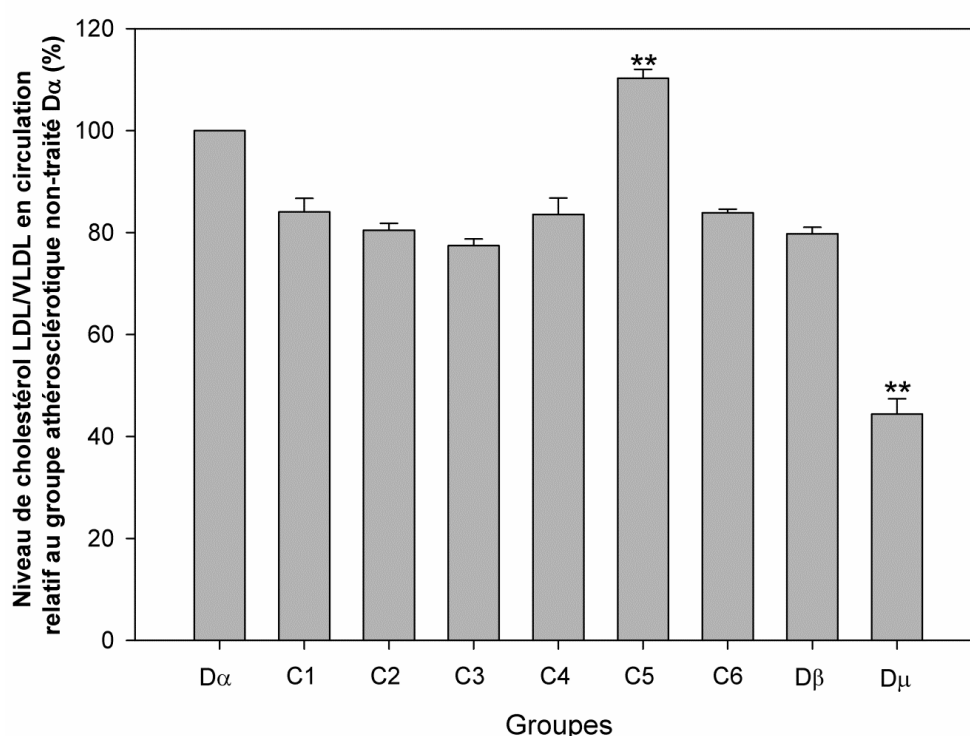


Figure 4-13: Détection du niveau de cholestérol LDL/VLDL en circulation au jour de l'euthanasie par test quantitatif de détection colorimétrique pour tous les groupes traités (C1-C6) et groupes contrôles (D α , D β et D μ), relativement au groupe athérosclérotique non-traité (D α). (n=4 à l'exception du groupe C1; n=3; p** < 0,01)

4.3.4 Analyse d'hépatotoxicité

La détermination du profil biochimique d'une souris athérosclérotique traitée a permis d'évaluer la toxicité hépatique induite suite à l'administration de nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB. L'endommagement du foie est évalué par l'entremise de tests mesurant l'albumine, la bilirubine, l'ALP, l'ALT, l'AST et la GGT. Les AST et les ALT sont des enzymes hépatiques intracellulaires dont la concentration dans le sérum correspond à un marqueur de dommage hépatique important. Ainsi, une concentration élevée d'AST et d'ALT indique la détérioration des cellules hépatiques parenchymateuses. De plus, une concentration élevée d'ALP, de GGT et de bilirubine dans le sérum indique une perturbation des fonctions hépatiques, tandis qu'une faible concentration d'albumine signifie que l'endommagement du foie a un impact sur ses fonctions de synthèse protéique (Gowda, et al., 2009; Harris, 2005).

Les échantillons de sérum prélevés des souris C5-2 (souris # 2 du groupe C5) et D α -1 (souris # 1 du groupe D α) ont été envoyés au laboratoire VITA-TECH afin d'obtenir leur caractérisation biochimique (Tableau 4.2). Étant donné la similarité entre le profil biochimique de la souris athérosclérotique traitée (C5-2) et la souris athérosclérotique non-traitée (D α -1), il est possible démettre l'hypothèse que l'administration de nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB n'a aucunement endommagé le foie ou nui à son fonctionnement. Les valeurs d'ALT et d'AST des deux souris ont été plus élevées que les valeurs de références présentées par la compagnie Charles River (Charles River Laboratories, 2005), ce qui pourrait indiquer une détérioration des cellules hépatiques. Par contre, les valeurs d'ALT et d'AST ont été légèrement élevées par l'hémolyse dans les échantillons de sérum envoyés à VITA-TECH. De plus, les valeurs élevées d'ALT et d'AST ont été une conséquence de la stéatose développée dans le foie des souris athérosclérotiques. Malgré l'effet de l'hémolyse et de la stéatose, les concentrations d'ALT et d'AST n'ont pas été assez élevées pour conclure que le foie des souris a été endommagé par les injections de chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB ou par le développement athérosclérotique des souris (Tableau 4.2). La fonction de synthèse protéique du foie n'a pas été affectée par les nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB ou par l'athérosclérose puisque les valeurs d'albumine mesurées ont dépassé légèrement la valeur de référence émise par Charles River (Tableau 4.2). Les valeurs d'ALP, de GGT et de bilirubine ont permis de croire que les fonctions

hépatiques n'ont pas été perturbées par l'administration de nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB ou par l'athérosclérose (Tableau 4.2).

Tableau 4.2: Profil biochimique des souris C5-2 (souris # 2 du groupe C5) et D α -1 (souris # 1 du groupe D α) au jour de l'euthanasie et les valeurs de référence du fournisseur Charles River (Charles River Laboratories, 2005).

Souris (Groupe-Souris)	C5-2	Dα-1	Normal
Albumine (g/L)	35	35	30,5 \pm 0,4
Bilirubine (Totale) (μ mol/L)	0,4	0,7	2,6 \pm 0,9
Bilirubine (Conjuguée) (μ mol/L)	0,1	0	-
ALP (IU/L)	58	55	162 \pm 44
ALT (IU/L)	120	121	38 \pm 7
AST (IU/L)	213	222	92 \pm 22
GGT (IU/L)	0	0	0,1 \pm 0,2
Hémolyse	1+	1+	-

4.3.5 Analyses histologiques

4.3.5.1 Accumulation de lipides dans le foie

La stéatose liée au développement de l'athérosclérose a été un paramètre d'étude important dans l'évaluation de l'efficacité thérapeutique des nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB. Ce type d'analyse a permis d'avoir une idée de l'envergure des effets phénotypiques induits par les nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB sur l'accumulation de vacuoles de gras dans le foie. Le développement de la stéatose chez les souris a été étudié par des analyses histologiques. Les coupes histologiques des tissus hépatiques ont été colorées à l'hématoxyline-éosine afin d'observer la présence de vacuoles de gras, caractéristique du développement athérosclérotique. Les graisses présentes dans le foie ont été dissoutes par les multiples bains d'éthanol et de xylène utilisés lors du paraffinage des coupes histologiques des tissus hépatiques. Suite à la coloration à l'hématoxyline-éosine, les graisses apparaissent en coloration négative sous forme de vacuoles. Les résultats ont démontré que la souris du groupe non-traité et nourri d'une alimentation riche en gras (groupe D α) a eu un nombre important de vacuoles de gras (mise en évidence par des flèches; Figure 4-14G). À l'opposé, la souris du groupe soumis à une diète

normale (groupe D μ) n'a présenté aucune accumulation de lipides au niveau du foie (Figure 4-14I). Les coupes histologiques des tissus hépatiques des souris des groupes C4, C5 et C6 ont montré la présence de nombreuses vacuoles de gras au moment de l'euthanasie des animaux (Figure 4-14D, E et F). Une souris du groupe C3 a toutefois présenté une histologie du foie comparable à celle d'une souris du groupe soumis à une diète normale (groupe D μ) (Figure 4-14C et I). Les souris du groupe C3 sont des souris athérosclérotiques traitées et dont la dernière injection a été donnée quatre semaines avant son sacrifice, impliquant que le traitement a eu un effet sur le foie qu'après une période prolongée. La préservation d'un foie sain a aussi été observée chez la souris du groupe C2 qui montre une très faible accumulation de lipides dans le foie (Figure 4-14B). Toutefois, l'agglomération de gras dans le foie de la souris du groupe C1 (Figure 4-14A) indique que six semaines après la dernière injection, la souris semble avoir recommencé le développement d'un foie gras. Le retour de la stéatose a été prévisible puisque les souris ont poursuivi leur diète riche en gras après les administrations de nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB. Une des souris du groupe injecté avec les siARN-ApoB seuls (groupe D β) a montré aussi une réduction du nombre de vacuoles de gras au moment de l'euthanasie (Figure 4-14H). La réduction de vacuoles de gras observée chez la souris du groupe D β a été plus importante que celle observée chez la souris du groupe C4, correspondant à une souris traitée avec les nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB et euthanasiée au même moment que la souris du groupe D β . Cependant, la réduction ralentie de la stéatose au niveau du foie de la souris du groupe C4 a pu être un effet retardé du traitement, les siARN-ApoB étant relâchés des nanoparticules formées de chitosane avec un certain délai.

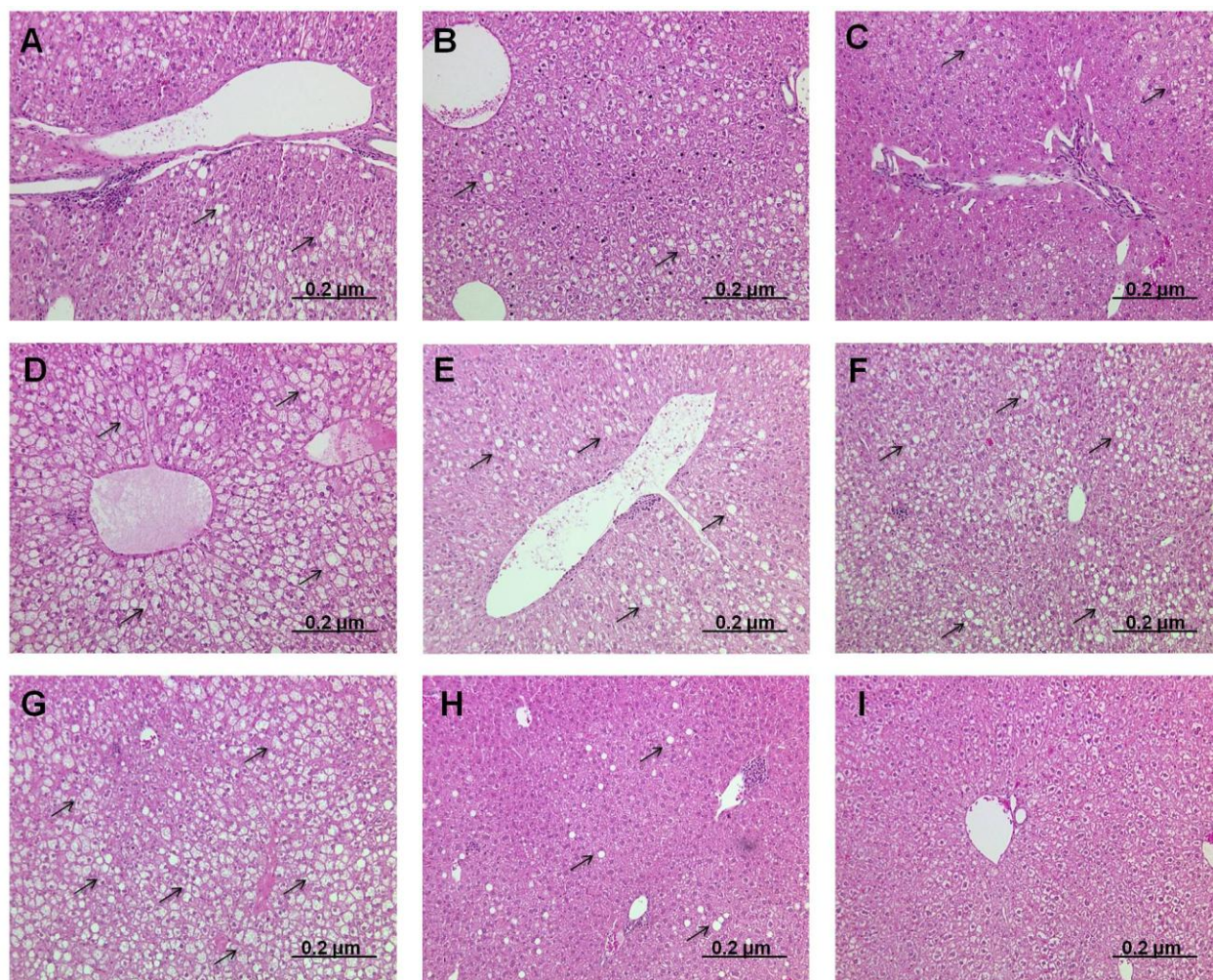


Figure 4-14: Coloration de coupes histologiques des tissus hépatiques par l'hématoxyline-éosine mettant en évidence l'accumulation de vacuoles de gras dans le foie d'une souris des groupes C1 (A), C2 (B), C3 (C), C4 (D), C5 (E), C6 (F), D α (G), D β (H) et D μ (I). (Flèche : exemple de vacuoles de gras)

4.3.5.2 Intégrité structurelle du foie

Afin d'évaluer l'effet des nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB sur la santé du foie, l'intégrité structurelle du foie a dû être étudiée. Les coupes histologiques des tissus hépatiques colorées au safranin-O/Fast-green/hématoxyline de fer ont permis d'analyser l'intégrité structurelle du foie (Figure 4-15). D'après les résultats observés, l'athérosclérose a donné lieu à de l'infiltration lymphoïde dans le foie de la souris du groupe athérosclérotique non-traité (groupe

D α), le contrôle positif d'athérosclérose (Figure 4-15G). À l'opposé, la souris du groupe non-athérosclérotique (groupe D μ) n'a présenté aucun signe de dommage hépatique (Figure 4-15I). L'administration de nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB aurait créé l'infiltration lymphoïde (Figure 4-15 E et F). Toutefois, étant donné que la souris du groupe athérosclérotique non-traité (groupe D α) a présenté des sites d'infiltration lymphoïde (Figure 4-15G), le développement athérosclérotique des animaux aurait pu jouer un rôle plus important dans la perturbation de l'intégrité structurelle du foie que les nanoparticules administrées. Par conséquent, l'infiltration lymphoïde observée dans le foie des souris des groupes traités C5 et C6 aurait pu être un effet du développement de l'athérosclérose au lieu des nanoparticules. Après une seule injection, le foie d'une souris du groupe C6 a présenté de multiples sites d'infiltration (Figure 4-15F). Deux semaines après l'administration d'une série de trois injections de nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB, le foie d'une souris du groupe C5 n'a présenté que quelques sites d'infiltration lymphoïde (Figure 4-15E). L'infiltration lymphoïde se serait résorbée trois semaines après la dernière injection (groupe C4; Figure 4-15D). Ainsi, toutes les autres souris athérosclérotiques traitées n'ont présenté aucun signe de dommages hépatiques à long terme (groupes C1-C4; Figure 4-15A-D). La résorption des sites d'infiltration lymphoïde pourrait être due à la diminution de la stéatose possiblement induite par les nanoparticules (Figure 4-14) ou pourrait être due à l'auto-guérison naturelle du foie. Comparativement à la souris du groupe C4 (Figure 4-15D), la souris du groupe D β n'ayant reçu que des injections de siARN-ApoB seuls a développé de multiples sites d'infiltration lymphoïde (Figure 4-15H), malgré la faible stéatose (Figure 4-14H). Contrairement à l'administration des nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB (Figure 4-15D), l'administration de siARN-ApoB seuls a résulté en de multiples sites d'infiltration lymphoïde toujours présents trois semaines suivant la dernière injection (Figure 4-15 H).

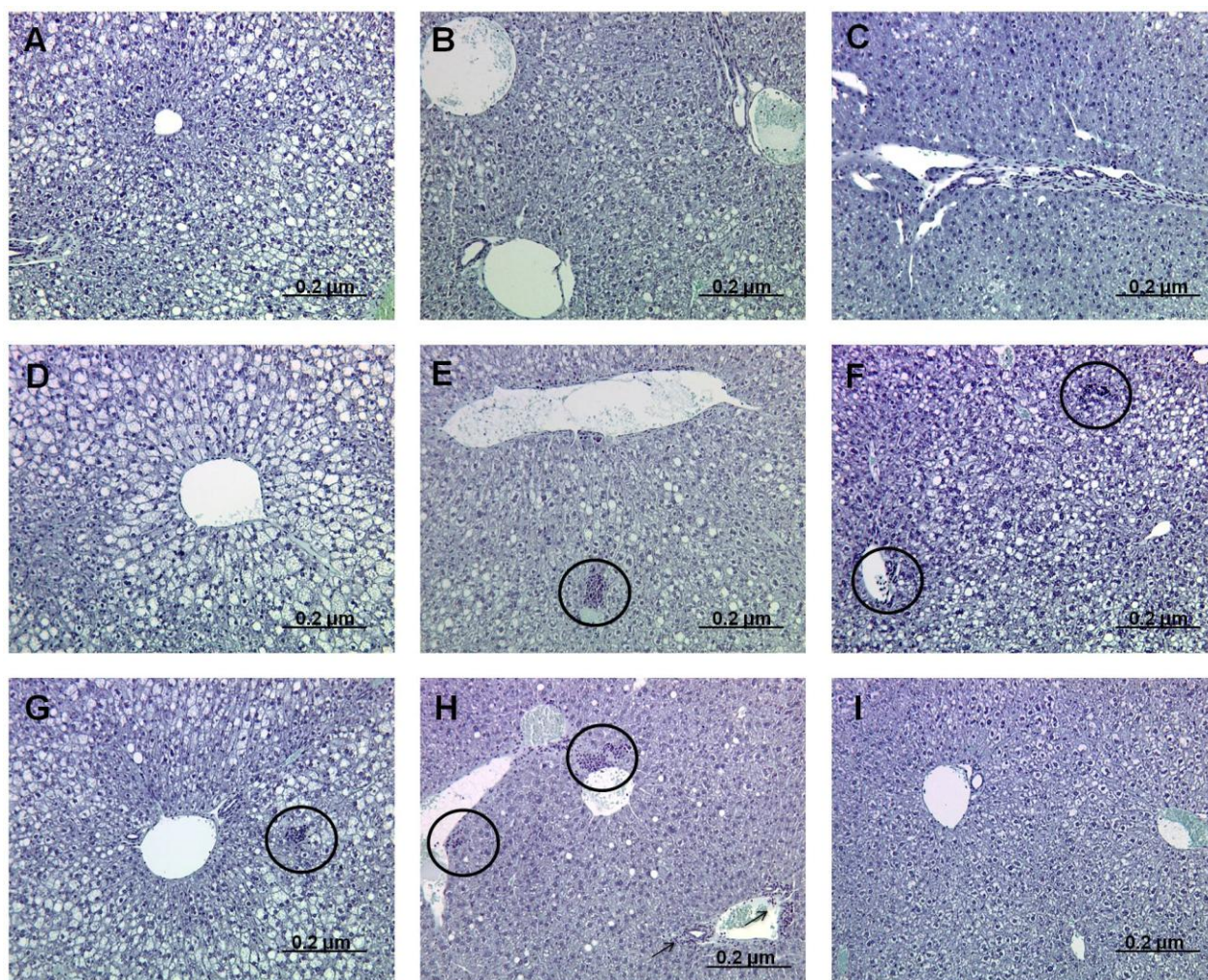


Figure 4-15: Coloration de coupes histologiques des tissus hépatiques par safranin-O/Fast-green/hématoxyline de fer mettant en évidence l'intégrité structurelle du foie d'une souris des groupes C1 (A), C2 (B), C3 (C), C4 (D), C5 (E), C6 (F), D α (G), D β (H) et D μ (I). (Cercle: site d'infiltration lymphoïde)

CHAPITRE 5 DISCUSSION

Dans le cadre de notre projet de recherche, des nanoparticules chitosane (92-10-5, 80-80-5 et 80-10-10)/ODNdb-ApoB ont été conçues et leurs propriétés physico-chimiques ont été caractérisées. De plus, une étude *in vitro* dans différents modèles cellulaires nous a permis d'évaluer l'efficacité de transfection des nanoparticules chitosane/ODNdb-ApoB ainsi que le silençage génique de l'ApoB induit par des nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB. Une étude *in vivo* a mis en évidence le potentiel thérapeutique et l'innocuité des nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB administrées par voie intraveineuse dans des souris athérosclérotiques. L'étude *in vivo* présente pour la première fois l'efficacité du chitosane non-modifié à livrer des siARN par voie intraveineuse. L'aboutissement de ce projet de recherche a permis de vérifier l'hypothèse de recherche soit que l'administration par voie intraveineuse des nanoparticules chitosane/siARN-ApoB est en mesure d'induire des effets thérapeutiques sécuritaires dans un modèle murin d'athérosclérose.

5.1 Caractérisation physico-chimique des nanoparticules chitosane/ODNdb-ApoB

Les propriétés physico-chimiques des nanoparticules chitosane/ODNdb-ApoB influencent leur efficacité de livraison et de transfection, affectant directement le silençage génique de l'ApoB. Étant donné la grande similarité structurelle entre les ODNdb-ApoB et les siARN-ApoB, la caractérisation physico-chimique des nanoparticules chitosane/ODNdb-ApoB permet d'éclaircir les raisons pour lesquelles les nanoparticules chitosane/siARN-ApoB sont aussi efficaces au niveau de la transfection cellulaire et au niveau de la livraison systémique.

D'après l'analyse par DLS et ESEM, les nanoparticules chitosane (92-10-5)/ODNdb-ApoB possède une gamme de tailles approximatives de 41-71 nm (Tableau 4.1) ce qui leur permettrait d'éviter l'élimination par filtration rénale (Soo Choi, et al., 2007) et de passer à travers les fenestrations des vaisseaux sanguins hépatiques des souris C57BL/6 (Snoeys, et al., 2007). De plus, un tel éventail de tailles permettrait aux nanoparticules d'éviter leur absorption par les cellules de Kupffer (Popielarski, Hu-Lieskovan, French, Triche, & Davis, 2005). La taille des nanoparticules chitosane (92-10-5)/ODNdb-ApoB mesurée par DLS et ESEM correspond à la gamme de tailles idéales pour la livraison systémique. L'analyse par DLS a suggéré que le

diamètre hydrodynamique des nanoparticules chitosane/ODNdb-ApoB augmente en fonction de la MM du chitosane, ce qui a contredit des travaux antérieurs (Liu, et al., 2007). Toutefois, cette observation a concordé avec les résultats obtenus dans nos laboratoires, résultats prochainement publiés. Les nanoparticules chitosane (92-10-5)/ODNdb-ApoB ont eu une taille inférieure aux SNALP (Judge, et al., 2006; Zimmermann, et al., 2006), aux nanoparticules chitosane-IAA-PEG-SVA/siARN-ApoB (Ghosn, et al., 2010), aux nanoparticules formées de poly-L-lysine dendritiques (Watanabe, et al., 2009) et aux nanoparticules d'or/cystéamine/siARN/PEI/HA (Lee, Park, et al., 2011). Cependant, elles ont eu une taille supérieure aux polyconjugués dynamiques (Rozema, et al., 2007). Le potentiel ζ élevé des nanoparticules chitosane/ODNdb-ApoB déterminé par DLS, variant entre 15 et 23 mV, pourrait grandement faciliter la transfection des nanoparticules dans différentes lignées cellulaires (Tableau 4.1). Les formulations de chitosane possédant un degré de désacétylation (DD) élevé (80 et 92 %) sont associées à des valeurs de potentiel ζ élevées, communément démontré dans la littérature (Mao, et al., 2010). En effet, l'excès de chitosane chargé présent avec toutes les formulations de chitosane utilisées dans notre projet de recherche a joué un rôle important dans la formation de nanoparticules possédant un potentiel ζ élevé. L'excès de chitosane associé aux formulations de chitosane 92-10-5, 80-80-5 et 80-10-10 est dû au ratio de charge chitosane : acides nucléiques (N:P) de 5 et de 10. D'après les observations faites par ESEM (Figure 4-1), les nanoparticules chitosane/ODNdb-ApoB sont de forme sphérique propre aux nanoparticules chitosane/siARN (Howard, et al., 2006) et chitosane/ADNp (Jean, et al., 2009).

L'analyse de la stabilité des nanoparticules chitosane/ODNdb-ApoB par PAGE (Figure 4-2, 4-3 et 4-4) a permis de déterminer que les formulations de chitosane possédant une faible MM utilisées à un faible ratio N:P sont en mesure de former des nanoparticules stables, à l'encontre des résultats avancés par Liu *et al.* (Liu, et al., 2007). Ainsi, l'utilisation de la formulation de chitosane 92-10-5 pourrait fournir la stabilité nécessaire aux nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB pour faciliter leur circulation dans le système sanguin, même durant une période prolongée. Les différents profils de stabilité associés à chaque formulation de chitosane (92-10-5, 80-80-5 et 80-10-10) ont mis en évidence l'influence du DD et de la MM sur la stabilité des nanoparticules, tel que rapporté pour les nanoparticules chitosane/ADNp (Ma, Lavertu, Winnik, & Buschmann, 2009) (Figure 4-2, 4-3 et 4-4). L'étude de protection contre les nucléases a

démontré que le chitosane protège efficacement les acides nucléiques contre des concentrations d'ADNase I supra-physiologiques indépendamment de la formulation de chitosane utilisée (Figure 4-5). Toutefois, la formulation de chitosane 80-80-5 a été en mesure de protéger légèrement plus les ODNdb-ApoB que les deux autres formulations (92-10-5 et 80-10-10), particulièrement contre 2 unités d'ADNase I/ μ g d'ODNdb. Le niveau de protection d'ODNdb-ApoB contre les nucléases pourrait donc être dépendant de la MM de la formulation de chitosane utilisée. La haute stabilité et le haut niveau de protection associés aux nanoparticules chitosane (92-10-5)/ODNdb-ApoB permettent d'envisager l'effet amoindri du pH physiologique et des nucléases en circulation sur les nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB administrées systématiquement lors de l'étude *in vivo*. Effectivement, de tels résultats indiquent que les nanoparticules formées de chitosane de faible MM et à un faible ratio N:P (92-10-5) pourrait conserver l'intégrité des siARN-ApoB du site d'injection jusqu'aux cellules hépatiques parenchymateuses. Dans les futures études *in vivo* d'envergure à venir, l'agrégation des nanoparticules chitosane/siARN-ApoB est un paramètre très important à évaluer étant donné son implication dans la livraison systémique.

5.2 Étude *in vitro*

L'induction de l'ARNi dans des cellules en culture ou dans un modèle animal est principalement limitée par la capacité des nanoparticules chitosane/siARN à franchir les barrières biologiques cellulaires. Ainsi, l'étude *in vitro* a permis d'explorer l'interaction des nanoparticules chitosane/ODNdb-ApoB avec différentes lignées cellulaires afin de mieux interpréter le niveau de silençage génique de l'ApoB induit par les nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB dans des hépatocytes. Cette approche scientifique basée sur un milieu contrôlé est une étape essentielle préalable à l'évaluation de l'efficacité thérapeutique des nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB dans un modèle animal athérosclérotique.

L'analyse par cytométrie en flux (Figure 4-6) a suggéré l'efficacité de transfection cellulaire des nanoparticules formées de chitosane 92-10-5, 80-80-5 et 80-10-10, dans différentes lignées cellulaires. En effet, un chitosane ayant un DD élevé (92 % et 80 %) forme des nanoparticules chitosane/ODNdb-ApoB ayant un potentiel ζ élevé (Tableau 4.1), favorisant l'internalisation cellulaire des nanoparticules par l'interaction optimale avec les membranes des cellules. La

formulation de chitosane 92-10-5 a atteint des niveaux de transfection de 55 % et 75 % pour les cellules HepG2 et RAW264.7 respectivement (Figure 4-6). La formulation de chitosane 92-10-5 reflète l'importance de l'équilibre entre le DD et la MM, initialement mise en évidence dans nos laboratoires pour la livraison d'ADNp (Lavertu, et al., 2006). Les trois lignées cellulaires (HepG2, HEK293 et RAW264.7) ont été sujettes à des niveaux de transfection très différents (Figure 4-6). Ce qui pourrait être principalement dû aux différentes voies d'endocytose utilisées par chaque type de cellules (Douglas, Piccirillo, & Tabrizian, 2008; Vercauteren, et al., 2010). Par conséquent, des études approfondies sur les voies d'endocytose des lignées cellulaires, HepG2, HEK293 et RAW264.7 devraient être faites afin de mieux comprendre les résultats générés par cytométrie en flux.

L'analyse par microscopie confocale des lignées cellulaires HepG2 (Figure 4-7), HEK293 (Figure 4-8) et RAW264.7 (Figure 4-9) a suggéré la capacité des nanoparticules chitosane (92-10-5)/ODNdb-ApoB à franchir les barrières biologiques cellulaires. L'efficacité d'internalisation cellulaire des nanoparticules chitosane (92-10-5)/ODNdb-ApoB déterminée par cytométrie en flux (Figure 4-6) a été confirmée par les images obtenues en microscopie confocale (Figure 4-7, 4-8 et 4-9). De plus, les nanoparticules chitosane (92-10-5)/ODNdb-ApoB ont été en mesure de se libérer des endolysosomes au cours des 24 heures suivant la transfection (Figure 4-7, 4-8 et 4-9). La déstabilisation des endolysosomes a été préalablement suggérée comme étant possiblement due à l'excès de chitosane associé aux nanoparticules chitosane/ADNp formées à un ratio N:P de 5 (Thibault, et al., 2011). Étant donné l'excès de chitosane associé au ratio N:P 5 de la formulation de chitosane 92-10-5 et le potentiel ζ élevé des nanoparticules chitosane (92-10-5)/ODNdb-ApoB, il est possible que les observations de Thibault *et al.* concordent avec nos observations des nanoparticules chitosane/siARN-ApoB (Thibault, et al., 2011). Les nanoparticules ont aussi été en mesure de se désassembler dans le cytoplasme des cellules au cours des 24 heures suivant la transfection cellulaire (Figure 4-7, 4-8 et 4-9). La libération des ODNdb-ApoB par le chitosane (92-10-5) pourrait être le résultat de la déstabilisation des nanoparticules due au pH intracellulaire. La déstabilisation des nanoparticules chitosane (92-10-5)/ODNdb-ApoB a été observée par PAGE après 20 heures d'incubation à pH 7, pH intracellulaire (Figure 4-2). Par conséquent, la majorité des nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB présentes dans le cytoplasme des cellules ont probablement été déstabilisées au

cours des 24 heures suivant la transfection (Figure 4-7, 4-8 et 4-9). La dissociation graduelle entre le chitosane (92-10-5) et les ODNdb-ApoB (ou siARN-ApoB) dans le cytoplasme des cellules correspond à une caractéristique très intéressante pour des nanoparticules thérapeutiques. Le relâchement graduel de siARN-ApoB dans le cytoplasme des cellules hépatiques parenchymateuses pourrait induire un silençage génique de l'ApoB étalé sur une longue période de temps menant donc à des effets thérapeutiques prolongés.

Le niveau de silençage génique de l'ApoB induit par les nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB dans les cellules hépatiques HepG2 (Figure 4-10) a corrélé avec le niveau de transfection atteint par les nanoparticules chitosane (92-10-5)/ODNdb-ApoB (Figure 4-6). Les nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB ont induit un silençage génique d'approximativement 50 %, correspondant à 20 % de moins que l'inhibition génique induite par les lipoplexes DharmaFECTTM1/siARN-ApoB (Figure 4-10). La différence entre les nanoparticules DharmaFECTTM1/siARN-ApoB et chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB pourrait reposer sur le relâchement graduel des siARN-ApoB dans les HepG2 par le chitosane (92-10-5). De ce fait, le niveau de silençage génique de l'ApoB induit par les nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB dans les cellules HepG2 serait moins élevé. Toutefois, cette hypothèse doit être examinée davantage dans de futures expériences. Notre étude *in vitro* a démontré que les nanoparticules chitosane/siARN de faible MM et à un faible ratio N:P peuvent être internalisées efficacement par les cellules et induire l'ARNi, contrairement à ce qui a été présenté par Lui *et al.* (Liu, et al., 2007).

5.3 Étude *in vivo*

La thérapie de l'athérosclérose par ARNi dépend de la capacité des nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB à franchir les multiples barrières biologiques systémiques et cellulaires. Par conséquent, l'efficacité de livraison du chitosane 92-10-5 non-modifié a été évaluée à travers l'importance, la durée et l'innocuité des effets thérapeutiques induits par les nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB. L'étude *in vivo* a permis de déterminer la diminution thérapeutique de l'ApoB et du cholestérol LDL/VLDL en circulation dans des souris à différents stades athérosclérotiques. Les répercussions d'une telle diminution d'agents athérogènes ont été

étudiées au niveau du poids et du foie des souris de manière à estimer l'innocuité des nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB.

L'administration de nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB, soit trois doses de siARN-ApoB de 1 mg/kg, a mené à une baisse d'ApoB en circulation de 30 %, relativement au groupe athérosclérotique non-traité (groupe D α) (Figure 4-12). Cette réduction est comparable à celle obtenue chez les souris ayant reçu une seule injection deux jours avant leur sacrifice (groupe C6; Figure 4-12). Les souris ayant reçu leur dernière injection de nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB six semaines avant leur sacrifice (groupe C1) ont présenté un niveau de réduction d'ApoB en circulation identique aux souris recevant leur dernière injection deux semaines avant leur sacrifice (groupe C5) (Figure 4-12). Cette similarité au niveau de la réduction d'ApoB en circulation semble indiquer une stabilisation du niveau d'ApoB suite au traitement. Ainsi, le patron d'administration établi lors de cette étude a pu favoriser la stabilisation du niveau d'ApoB à des valeurs comparables à celles des souris non-athérosclérotiques (groupe D μ) (Figure 4-12). En effet, trois injections étalées uniformément sur trois semaines ont permis le rétablissement du niveau d'ApoB à une valeur normale pour tous les groupes de souris traitées, indépendamment de l'importance du développement athérosclérotique. Il est très important d'évaluer l'efficacité du traitement de l'athérosclérose par ARNi en limitant les changements phénotypiques de manière à ne pas induire des problèmes tels que l'abêtalipoprotéïnémie artificielle menant à l'hypocholestérolémie (Lackner, et al., 1986; Zamel, Khan, Pollex, & Hegele, 2008). La réduction du niveau d'ApoB en circulation indique une baisse de l'expression de l'ARNm ApoB dans les souris athérosclérotiques. Toutefois, le silençage génique *in vivo* de l'ApoB devra être confirmé dans le futur comme étant dû aux siARN-ApoB livrés par le chitosane et non dû aux effets non-spécifiques du chitosane ou d'une réaction immunitaire.

La baisse d'ApoB en circulation s'est reflétée dans une réduction de 20 % du niveau de cholestérol LDL/VLDL en circulation, relativement au groupe athérosclérotique non-traité (groupe D α) (Figure 4-12 et 4-13). Similairement à la réduction du niveau d'ApoB en circulation, l'administration des nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB a mené à la réduction du niveau de cholestérol LDL/VLDL en circulation indépendamment de la sévérité de l'athérosclérose des souris. La diminution du niveau d'ApoB en circulation est accompagné d'une baisse du niveau de cholestérol LDL/VLDL en circulation étant donné le rôle essentiel de

l'ApoB dans la formation de LDL et de VLDL (Olofsson & Boren, 2005). Le niveau de cholestérol LDL/VLDL en circulation des souris traitées n'a pas atteint une valeur propre aux souris non-athérosclérotiques, contrairement à ce qui a été observé pour le niveau d'ApoB (Figure 4-12 et 4-13). Ceci est dû au fait que la fraction de cholestérol total transporté dans les sujets sains par les LDL est de 70 %, mais une diète riche en gras peut causer la répartition du cholestérol total dans plusieurs autres lipoprotéines athérogènes (Marcovina & Packard, 2006). Ainsi, le niveau de cholestérol LDL/VLDL mesuré lors de ce projet de recherche peut être associé à un nombre élevé de VLDL plutôt qu'à un nombre élevé de LDL transportant moins de cholestérol. Par conséquent, une réduction importante du nombre de LDL en circulation suite au traitement ne contribuerait pas beaucoup à la diminution du niveau de cholestérol total, car les VLDL transportent beaucoup plus de cholestérol que les LDL (Walldius & Jungner, 2006). Heureusement, une diminution importante du nombre de LDL en circulation contribue davantage au traitement de l'athérosclérose qu'une réduction du niveau de cholestérol LDL/VLDL (Benn, 2009). Dans ce projet, il n'a pas été possible d'étudier le niveau de cholestérol associé à toutes les autres lipoprotéines athérogènes. Par contre, la détermination du niveau de cholestérol LDL/VLDL, qui représente la majorité du cholestérol, a permis de démontrer une baisse importante du cholestérol en circulation chez les souris traitées (Figure 4-13). Un projet complémentaire basé sur l'expérimentation *in vivo* de la présente étude vise à évaluer la réduction du niveau d'ApoB par immunohistochimie au niveau du foie et du jéjunum par l'entremise d'anticorps spécifiques à l'ApoB. De plus, l'analyse sera poursuivie en observant l'évolution de la réponse phénotypique à différents temps suivant la première injection. L'effet distinct de chaque injection sur l'organisme des souris athérosclérotiques sera étudié en parallèle.

La réduction du niveau d'ApoB et de cholestérol LDL/VLDL en circulation s'est étalée sur au moins six semaines en dépit du fait que les souris ont poursuivi leur diète riche en gras après l'administration des nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB (Figure 4-12 et 4-13). Ces effets phénotypiques prolongés ont été observés chez les souris recevant des traitements préventifs précédents l'athérogénèse (groupe C1; Figure 4-12 et 4-13). Sachant que l'expression de l'ApoB est régulée à la hausse suite à l'initiation de la diète riche en gras (Thompson, Naoumova, & Watts, 1996), les injections de nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB ont été en mesure de préserver des teneurs saines d'ApoB jusqu'à la fin de l'expérimentation *in*

vivo. De plus, les souris ayant reçu les injections après une longue période de développement athérosclérotique ont été en mesure de sécréter moins d'ApoB et de cholestérol LDL/VLDL, malgré la présence d'une plus grande quantité de cholestérol total associée à l'athérosclérose (Thompson, et al., 1996). Il semble donc que le stade athérosclérotique des animaux n'ait pas affecté l'efficacité thérapeutique des nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB.

Similairement aux nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB, l'administration de siARN-ApoB seuls a induit des effets phénotypiques remarquables. Effectivement, les niveaux d'ApoB et de cholestérol LDL/VLDL en circulation des souris du groupe D β ont été réduits suite à l'administration de siARN-ApoB seuls (Figure 4-12 et 4-13). Ainsi, les effets phénotypiques induits chez les souris du groupe D β ont été aussi importants que ceux obtenus chez les souris ayant reçu des injections de nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB (Figure 4-12 et 4-13). Ces résultats contredisent les études réalisées dans le passé démontrant que les siARN seuls se font rapidement éliminer du système sanguin et se font excréter par les reins (Hatanaka, et al., 2010). Malgré cela, il est possible d'administrer efficacement des siARN seuls non-modifiés dans le but d'atteindre les hépatocytes par l'entremise d'injections intraveineuses hydrodynamiques (Lewis & Wolff, 2007). De plus, l'induction du silençage génique d'ApoB a déjà été induite suite à l'administration par voie intraveineuse de siARN-ApoB seuls à une dose très élevée (50 mg/kg) (Soutschek, et al., 2004). Étant donné que les souris du groupe D β n'ont reçu aucune injection hydrodynamique et que la dose administrée aux souris a été de 1 mg/kg, les résultats sont d'autant plus intéressants. Hypothétiquement, les siARN-ApoB seuls administrés par voie intraveineuse aux souris du groupe D β auraient pu atteindre rapidement et efficacement les cellules hépatiques grâce à l'effet de perméabilité et de rétention (EPR) du foie occasionné par l'inflammation hépatique qui est induite par l'athérosclérose (Bigorgne, et al., 2008). Toutefois, des études plus approfondies seront réalisées prochainement pour vérifier la possibilité d'induire des effets thérapeutiques dans des souris athérosclérotiques suite à l'administration de siARN-ApoB seuls par voie intraveineuse.

Les effets thérapeutiques obtenus par l'entremise de nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB diffèrent de ceux obtenus en réponse au traitement de Crooke *et al.*. Le traitement de Crooke *et al.* a consisté à l'administration intrapéritonéale d'oligonucléotides antisens (ASO :

antisens oligonucleotide) seuls injectés deux fois par semaine durant six semaines à des doses comparables à celles utilisées par Soutschek *et al.* (25 et 50 mg/kg) (Crooke, et al., 2005; Soutschek, et al., 2004). Malgré l'induction d'effets thérapeutiques étalés sur six semaines, Crooke *et al.* ont remarqué une baisse de l'importance des effets thérapeutiques deux semaines après la fin de leur traitement (Crooke, et al., 2005), contrairement aux observations faites lors de notre projet de recherche. De plus, l'efficacité thérapeutique des ASO a été liée à des doses non-transférables à l'humain et à l'utilisation d'une voie d'administration trop invasive étant donné les multiples injections d'ASO nécessaires.

Récemment, Tadin-Strapps *et al.* ont réussi à réduire d'approximativement 65 % le niveau total de cholestérol dans des souris LDLr^{+/-} CETP^{+/-}. Cette réduction étalée sur trois semaines a été induite suite à l'administration d'une seule dose de liposomes à une seule dose de siARN-ApoB de 3 mg/kg (Tadin-Strapps, et al., 2011). Toutefois, en administrant dans le même modèle de souris les mêmes liposomes en deux doses de siARN-ApoB de 3 mg/kg au lieu d'une, Ason *et al.* ont obtenu des résultats surpassant ceux de Tadin-Strapps *et al.* (Ason, et al., 2011; Tadin-Strapps, et al., 2011). En effet, ils ont induit une réduction d'approximativement 85 % du niveau de cholestérol total, étalée sur trois semaines (Ason, et al., 2011). Par contre, les traitements par liposomes ont induit la réduction du niveau de HDL non-athérogènes, un phénomène aussi observé par Crooke *et al.* (Ason, et al., 2011; Crooke, et al., 2005; Tadin-Strapps, et al., 2011). L'effet des nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB sur la sécrétion de HDL sera étudié dans un futur projet d'envergure. En utilisant des nanoparticules lipides/acides nucléiques stables (SNALP : *stable nucleic acid-lipid particles*), Judge *et al.* ont réduit respectivement le niveau d'ApoB et de cholestérol d'approximativement 80 % et 45 % dans des souris non-athérosclérotiques suite à l'administration de trois doses de siARN-ApoB de 5 mg/kg étalées sur trois jours (Judge, et al., 2006). Toujours avec les SNALP, Zimmermann *et al.* ont réduit le niveau d'ApoB de souris non-athérosclérotiques d'approximativement 80 % par l'entremise d'une seule dose de siARN-ApoB de 2,5 mg/kg (Zimmermann, et al., 2006). Les iNOP-7 administrées en trois doses de siARN-ApoB de 1,25 mg/kg dans des souris C57BL/6 n'ont eu effet que quatre jours suivant le traitement (Baigude, et al., 2007). L'administration de lipoïdes en une seule dose de siARN-ApoB de 3 mg/kg a mené à une réduction de l'expression d'ApoB d'approximativement 70 % dans un modèle murin non-athérosclérotique. Cependant, ces lipoïdes

n'ont subi aucune évaluation thérapeutique à long terme limitant ainsi leur étude comme nanoparticules thérapeutiques ciblant l'athérosclérose (Akinc, et al., 2008). Comparativement aux nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB, l'administration de siARN-ApoB par l'entremise de systèmes de livraison lipidiques n'a pas été en mesure de préserver des niveaux réduits d'ApoB et de cholestérol durant une période prolongée. Ce qui laisse croire que les nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB pourrait permettre la libération graduelle de siARN-ApoB dans les cellules, les rendant plus intéressantes pour la thérapie de l'athérosclérose.

Des polymères modifiés ont aussi été utilisés à des doses de siARN-ApoB beaucoup plus faibles que ce qui a initialement été administré par Soutschek *et al.* tout en offrant une aussi bonne efficacité (Soutschek, et al., 2004). Avec une seule dose de siARN-ApoB de 2,5 mg/kg, l'utilisation de polyconjugués dynamiques a mené à une réduction du niveau de cholestérol total en circulation d'approximativement 40 % (Rozema, et al., 2007). Cependant, la réduction du niveau de cholestérol total n'a été observée que durant une semaine et aucune analyse de longue durée n'a été envisagée (Rozema, et al., 2007). De plus, l'étude évaluant l'efficacité des polyconjugués dynamiques n'a abordé que l'effet d'une seule injection, sans considérer les répercussions d'un patron d'injections thérapeutique, tel que présenté dans notre projet de recherche (Rozema, et al., 2007). Le chitosane-imidazole-4-acide acétique couplé à une molécule de PEG-SVA (chitosane-IAA-PEG-SVA) a livré des siARN-ApoB systémiquement et a mené à un silençage génique de l'ApoB variant en fonction de la dose de siARN-ApoB utilisée (Ghosn, et al., 2010). Or, l'administration par voie intraveineuse de deux doses de siARN-ApoB de 1 mg/kg étalées sur deux jours a conduit à un niveau d'inhibition génique faible d'approximativement 10 % dans des souris non-athérosclérotiques BALB/C (Ghosn, et al., 2010). Ghosn *et al.* ont formé des nanoparticules à un ratio N:P 40 en utilisant une formulation de chitosane de DD (86 %) et de MM (130 kDa) très élevés menant à des niveaux de silençage génique très variables (Ghosn, et al., 2010). L'inefficacité *in vivo* des nanoparticules chitosane-IAA-PEG-SVA/siARN-ApoB pourrait être associée à l'absence d'équilibre entre le DD et la MM de la formulation de chitosane (86-130-40) (Ghosn, et al., 2010). La facilité qu'ont les nanoparticules chitosane (92-10-5)/ODNdb-ApoB à transfecter des hépatocytes en culture (Figure 4-6) ainsi que les effets phénotypiques remarquables observés dans notre étude *in vivo* (Figure 4-12 et 4-13) indiquent que l'équilibre entre le DD et la MM du chitosane pourrait avoir

une influence *in vivo*. D'ailleurs, l'utilisation *in vivo* de la formulation de chitosane 92-10-5 a déjà été démontrée comme étant prometteur pour la livraison d'ADNp dans un modèle animal diabétique (Jean, Alameh, Buschmann, & Merzouki, 2011b). Malgré tout, l'influence de l'équilibre entre le DD et la MM du chitosane sur l'efficacité des nanoparticules chitosane/siARN dans un modèle animal devra être confirmée dans de futures expérimentations.

L'athérosclérose est une source importante de stéatose, il s'agit donc d'un paramètre intéressant à étudier pour évaluer l'efficacité thérapeutique des nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB. La thérapie par ARNi induite par les nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB n'a pas favorisé le développement de la stéatose (Figure 4-14), contrairement à ce qui a été observé par Rozema *et al.*, Tadin-Strapps *et al.* et Ason *et al.* (Ason, et al., 2011; Rozema, et al., 2007; Tadin-Strapps, et al., 2011). L'absence d'accumulation de gras dans le foie a concordé avec les observations faites dans plusieurs études où l'induction du silençage génique de l'ApoB a été un succès (Crooke, et al., 2005; Judge, et al., 2006; Soutschek, et al., 2004; Zimmermann, et al., 2006). Notre projet de recherche a suggéré une diminution graduelle du nombre de vacuoles de gras dans le foie des souris suivant la dernière injection du traitement, malgré la poursuite d'une diète riche en gras (Figure 4-14). Cette diminution étalée sur quatre semaines a mené à l'obtention d'un foie sain (Figure 4-14C). Par contre, la stéatose a lentement récidivé cinq semaines après la fin du traitement (Figure 4-14B). Sachant que le développement de la stéatose est une conséquence de la diète riche en gras donnée aux souris (Carmiel-Haggai, et al., 2005; Hoffler, et al., 2009), la reprise du développement de la stéatose dans le foie des souris traitées pourrait être le résultat de la continuation de la diète riche en gras suite au traitement. Afin de confirmer ces observations, une analyse histologique sur plus d'échantillons devrait être faite et une méthode de quantification de vacuoles de gras devrait être développée. L'analyse des coupes histologiques sur les tissus hépatiques de toutes les souris est en cours. Un projet annexe analysant l'accumulation de cholestérol dans l'intima des artères du cœur par l'histologie du cœur des souris est présentement en cours.

Les siARN, les systèmes de livraison ainsi que l'ARNi induite dans le foie peuvent mener à l'hépatotoxicité, malgré l'induction d'effets thérapeutiques remarquables. Il est donc important d'évaluer l'immunogénicité et le potentiel toxique des nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB au niveau du foie où la majorité des siARN s'accumulent (Akhtar & Benter,

2007b). D'après l'analyse d'hépatotoxicité (Tableau 4.2) et l'analyse histologique du foie (Figure 4-15), l'administration des nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB n'a pas créée d'hépatotoxicité. En effet, les niveaux d'AST et d'ALT d'une souris athérosclérotique recevant les nanoparticules thérapeutiques et ceux d'une souris athérosclérotique non-traitée sont très similaires. Par conséquent, les nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB n'ont pas interféré dans les fonctions hépatiques. Cependant, les valeurs d'AST et d'ALT déterminées dans notre étude sont nettement plus élevées que celles mesurées par d'autres chercheurs (Nishina, et al., 2008; Rozema, et al., 2007; Tadin-Strapps, et al., 2011; Watanabe, et al., 2009). Cette différence repose sur la présence d'hémolyse dans les échantillons de sérum récoltés lors de notre étude, augmentant artificiellement les valeurs d'AST et d'ALT. De plus, l'élévation des niveaux d'AST et d'ALT a aussi été une conséquence de la stéatose observée chez les souris athérosclérotiques (Figure 4-14) (Hoffler, et al., 2009). Par conséquent, puisque Nishina *et al.*, Rozema *et al.*, Watanabe *et al.* et Tadin-Strapps *et al.* n'ont pas utilisé de souris athérosclérotiques dans leur étude, il est normal d'observer une différence entre leurs niveaux de transaminases et les nôtres (Nishina, et al., 2008; Rozema, et al., 2007; Tadin-Strapps, et al., 2011; Watanabe, et al., 2009).

De plus, l'infiltration lymphoïde survenue dans le foie des souris suite aux trois injections s'est résorbée après trois semaines (groupe C4; Figure 4-15D). Toutefois, l'inflammation dans le foie a pu être associée au développement de la stéatose (Bigorgne, et al., 2008) plutôt qu'aux nanoparticules thérapeutiques puisque l'infiltration lymphoïde a été identifiée dans le foie des souris athérosclérotiques recevant aucune injection (groupe Dα; Figure 4-15). De plus, les souris recevant les injections de siARN-ApoB seuls ont exhibé plusieurs sites d'infiltration lymphoïde au niveau de leur foie (groupe Dβ; Figure 4-15H) comparativement au groupe de souris ayant reçu aux mêmes moments les injections de nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB (groupe C4; Figure 4-15D). Sachant que le chitosane peut contribuer à la viabilité cellulaire (Noh, et al., 2010; Tan, Krishnaraj, & Desai, 2000), l'hépatotoxicité des siARN-ApoB livrés par le chitosane (92-10-5) a pu être contrée par la stimulation cellulaire incitée par le chitosane. Étant donné l'absence de stéatose importante dans le foie des souris recevant des injections de siARN-ApoB seuls (groupe Dβ; Figure 4-14H), l'infiltration lymphoïde observée pour ces souris pourrait être uniquement due aux siARN-ApoB seuls et non à l'accumulation de vacuoles de gras au

niveau du foie. L'hépatotoxicité de siARN-ApoB seuls pourrait être due à leur absorption dans les cellules de Kupffer, favorisant ainsi l'induction de sites d'inflammation au niveau du foie. L'absence de multiples sites d'inflammation au niveau du foie des souris recevant les nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB pourrait suggérer la spécificité du chitosane pour les cellules hépatiques parenchymateuses, ce qui permettrait d'éviter les cellules de Kupffer. Des études plus élaborées doivent être réalisées afin de comprendre l'effet hépatotoxique des siARN-ApoB seuls.

Judge *et al.* ont signalé une perte de poids importante liée à la toxicité induite par l'administration de siARN-ApoB non-modifiés encapsulés dans des SNALP (Judge, et al., 2006). Similairement, la première de trois injections de nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB a conduit à la stabilisation (groupe C4 et C5) du poids des souris athérosclérotiques pendant une semaine (groupe C4 - semaine du 21-12-10 au 28-12-10 et groupe C5 – semaine du 28-12-10 au 04-01-11; Figure 4-11). Toutefois, le chitosane n'a pas nécessairement été la cause de la perturbation de l'évolution du poids des souris étant donné que la première injection de siARN-ApoB seuls a aussi mené à la stabilisation du poids pendant une semaine (groupe D β - semaine du 21-12-10 au 28-12-10; Figure 4-11). Il semblerait que les siARN-ApoB aient un effet indirect de courte durée sur le poids des souris. Malgré l'effet de la première injection, les injections subséquentes n'ont eu aucune influence sur le poids des souris. Par conséquent, l'absence de chutes de poids drastiques durant le traitement des souris athérosclérotiques met en évidence l'aspect non-hépatotoxique des nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB. L'absence d'hépatotoxicité pourrait principalement être due au fait que les nanoparticules n'ont pas été absorbées par les cellules de Kupffer (Roberts, et al., 2007). En effet, la capacité des nanoparticules à éviter l'internalisation par les cellules immunitaires du foie pourrait être expliquée par leur taille, mais aussi par leur spécificité pour les cellules hépatiques parenchymateuses.

À la lumière de ce qui précède, une stabilisation prolongée du niveau d'ApoB en circulation à une valeur normale et l'absence d'hépatotoxicité suggère tout au plus la spécificité des monomères formant le chitosane aux récepteurs des hépatocytes. Par contre, le chitosane n'a jamais été reporté comme étant spécifique aux hépatocytes. Cependant, la livraison active de siARN par le chitosane a été faite antérieurement grâce à la conjugaison d'une molécule de galactose dans le but de cibler les récepteurs asialoglycoprotéines (ASGP-R) (Gao, et al., 2003).

Les monosaccharides N-acétyl-D-glucosamine du chitosane diffèrent du galactose par la disposition équatoriale du groupe hydroxyle présent à la position C-4, obstruant ainsi la liaison avec les ASGP-R. Cependant, Kim *et al.* ont démontré qu'un système de livraison polymérique dérivé du glucose peut être utilisé afin de cibler les ASGP-R, malgré la position inverse du groupe hydroxyle à la position C-4 gênant la formation d'une liaison hydrogène avec le récepteur hépatique (Kim, Goto, & Akaike, 2001). Par conséquent, les chaînes polymériques du chitosane ont pu interagir avec les ASGP-R par des liaisons multivalentes de manière à combler la liaison hydrogène nécessaire à la reconnaissance des ASGP-R. Ainsi, les multiples groupes hydroxyles des monomères N-acétyl-D-glucosamine et l'effet polymérique du chitosane ont possiblement contribué à la spécificité des nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB. Hypothétiquement, la spécificité aux cellules hépatiques parenchymateuses aurait contribué à l'efficacité thérapeutique prolongée des nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB ainsi qu'à leur innocuité.

Notre preuve de concept suggère l'utilisation des nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB comme des agents potentiellement thérapeutiques et sécuritaires visant la prévention et le traitement de l'athérosclérose. Notre preuve de concept correspond au point de départ d'un projet d'envergure visant l'inhibition génique de l'ARNm ApoB dans un modèle animal athérosclérotique en utilisant des nanoparticules chitosane/siARN-ApoB injectées par voie intraveineuse.

CONCLUSION

L'ApoB est une protéine sécrétée par les cellules hépatiques parenchymateuses dans le but de former des lipoprotéines de faibles densités, telles que les VLDL et les LDL, assurant le transport systémique du cholestérol du foie vers différents tissus. L'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique dont l'initiation et le développement reposent sur l'accumulation de VLDL et de LDL dans l'intima des artères. Malheureusement, il n'existe aucun traitement sur le marché permettant de cibler la source de l'athérosclérose. La réduction de la sécrétion d'ApoB nuirait à la formation de lipoprotéines athérogènes ce qui mènerait à la prévention ou même l'arrêt du développement athérosclérotique. Dans le cadre de ce projet de recherche, nous avons induit pour la première fois des effets thérapeutiques sécuritaires dans des souris athérosclérotiques suite à l'administration par voie intraveineuse des nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB.

Notre projet de recherche nous a permis de concevoir des nanoparticules chitosane/ODNdb-ApoB et de caractériser leurs propriétés physico-chimiques. Les résultats de la caractérisation physico-chimique des nanoparticules nous a permis de mettre en évidence les propriétés physico-chimiques des nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB.

Nos travaux de recherche ont montré que les nanoparticules chitosane (92-10-5)/ODNdb-ApoB sont en mesure de transfecter différentes lignées cellulaires, dont des hépatocytes. Les nanoparticules chitosane (92-10-5)/ODNdb-ApoB serait vraisemblablement en mesure d'internaliser les cellules, de se libérer des endolysosomes et de relâcher les ODNdb-ApoB dans le cytoplasme des cellules transfectées. De plus, nous avons démontré que l'inhibition de l'expression de l'ARNm ApoB dans des cellules hépatiques en culture se fait efficacement avec les nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB.

Nous avons évalué les effets thérapeutiques des nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB administrées par voie intraveineuse à une dose de siARN-ApoB de 1 mg/kg dans des souris athérosclérotiques. Indépendamment de la sévérité de l'athérosclérose, le niveau d'ApoB en circulation des souris athérosclérotiques traitées a été réduit à une valeur comparable à celle des souris non-athérosclérotiques. La diminution de la sécrétion d'ApoB suite au traitement s'est reflétée par une diminution du niveau de cholestérol LDL/VLDL en circulation. Les effets thérapeutiques induits par les nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN-ApoB ont duré au moins

six semaines en l'absence d'hépatotoxicité. L'infiltration lymphoïde dans le foie des souris athérosclérotiques traitées se serait résorbée au cours de l'expérimentation étant donné la diminution de la stéatose possiblement causée par les nanoparticules thérapeutiques.

Les travaux prometteurs de ce projet de recherche innovateur seront poursuivis ultérieurement afin d'évaluer les effets thérapeutiques associés à chaque injection ainsi que le niveau de silençage génique de l'ApoB induit dans les tissus du foie et du jéjunum. La thérapie de l'athérosclérose par ARNi menée par des nanoparticules chitosane/siARN-ApoB sera étudiée avec plus de précision dans le futur dans le but de mieux comprendre le mécanisme thérapeutique de ces nanoparticules. Le développement d'une thérapie innovatrice par ARNi utilisant des nanoparticules chitosane/siARN-ApoB pour traiter les individus atteints de l'athérosclérose correspond à une initiative importante pour la croissance du domaine des thérapies de nouvelle génération.

BIBLIOGRAPHIE

- Aagaard, L., & Rossi, J. J. (2007). RNAi therapeutics: Principles, prospects and challenges. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59(2-3), 75-86
- Agence de la santé publique du Canada. (2009). 2009 Suivi des maladies du cœur et des accidents vasculaires cérébraux au Canada. *Agence de la santé publique du Canada*. Repéré le 3 juillet 2011 à <http://www.phac-aspc.gc.ca/publicat/2009/cvd-avc/summary-resume-fra.php>
- Aiello, A. E., Diez-Roux, A., Noone, A.-M., Ranjit, N., Cushman, M., Tsai, M. Y., et al. (2009). Socioeconomic and psychosocial gradients in cardiovascular pathogen burden and immune response: The multi-ethnic study of atherosclerosis. *Brain, Behavior, and Immunity*, 23(5), 663-671
- Aigner, A. (2007). Applications of RNA interference: Current state and prospects for siRNA-based strategies in vivo. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(1), 9-21
- Akhtar, S., & Benter, I. (2007a). Toxicogenomics of non-viral drug delivery systems for RNAi: Potential impact on siRNA-mediated gene silencing activity and specificity. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59(2-3), 164-182.doi:10.1016/j.addr.2007.03.010
- Akhtar, S., & Benter, I. F. (2007b). Nonviral delivery of synthetic siRNAs in vivo. *Journal of Clinical Investigation*, 117(12), 3623-3632.doi:10.1172/jci33494
- Akinc, A., Zumbuehl, A., Goldberg, M., Leshchiner, E. S., Busini, V., Hossain, N., et al. (2008). A combinatorial library of lipid-like materials for delivery of RNAi therapeutics. *Nature Biotechnology*, 26(5), 561-569
- Alameh, M., Jean, M., Dejesus, D., Buschmann, M. D., & Merzouki, A. (2010). Chitosanase-based method for RNA isolation from cells transfected with chitosan/siRNA nanocomplexes for real-time RT-PCR in gene silencing. *IJN*, 5, 473-481
- Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R., & Flavell, R. A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3. *Nature*, 413(6857), 732-738
- Allender, S., Scarborough, P., Peto, V., Rayner, M., Leal, J., Luengo-Fernandez, R., et al. (2008). European cardiovascular disease statistics 2008 (D. o. P. Health, Trans.). Oxford: University of Oxford.
- American Heart Association. (2010). Heart Disease And Stroke Statistics : 2010 Update At-A-Glance. Dallas, TX: American Heart Association.
- Ason, B., Castro-Perez, J., Tep, S., Stefanni, A., Tadin-Strapps, M., Roddy, T., et al. (2011). ApoB siRNA-induced Liver Steatosis is Resistant to Clearance by the Loss of Fatty Acid Transport Protein 5 (Fatp5). *Lipids*, 1-13.doi:10.1007/s11745-011-3596-3
- Assmann, G., & Gotto, A. M., Jr. (2004). HDL Cholesterol and Protective Factors in Atherosclerosis. *Circulation*, 109(23_suppl_1), III-8-14.doi:10.1161/01.cir.0000131512.50667.46

- Austin, M. A., Hutter, C. M., Zimmern, R. L., & Humphries, S. E. (2004). Familial Hypercholesterolemia and Coronary Heart Disease: A HuGE Association Review. *American Journal of Epidemiology*, 160(5), 421-429.doi:10.1093/aje/kwh237
- Baigude, H., McCarroll, J., Yang, C.-s., Swain, P. M., & Rana, T. M. (2007). Design and Creation of New Nanomaterials for Therapeutic RNAi. *ACS Chemical Biology*, 2(4), 237-241.doi:10.1021/cb7000582
- Bedikian, A. Y., & Del Vecchio, M. (2008). Allovectin-7 therapy in metastatic melanoma. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 8(6), 839-844.doi:10.1517/14712598.8.6.839
- Benn, M. (2009). Apolipoprotein B levels, APOB alleles, and risk of ischemic cardiovascular disease in the general population, a review. *Atherosclerosis*, 206(1), 17-30
- Bigorgne, A. E., Bouchet-Delbos, L., Naveau, S., Dagher, I., Prévot, S., Durand-Gasselín, I., et al. (2008). Obesity-Induced Lymphocyte Hyperresponsiveness to Chemokines: A New Mechanism of Fatty Liver Inflammation in Obese Mice. *Gastroenterology*, 134(5), 1459-1469.e1452.doi:10.1053/j.gastro.2008.02.055
- Binder, C. J., Chang, M.-K., Shaw, P. X., Miller, Y. I., Hartvigsen, K., Dewan, A., et al. (2002). Innate and acquired immunity in atherogenesis. *Nature Medicine*, 8(11), 1218-1226.doi:1028452631
- Bricarello, D. A., Smilowitz, J. T., Zivkovic, A. M., German, J. B., & Parikh, A. N. (2010). Reconstituted Lipoprotein: A Versatile Class of Biologically-Inspired Nanostructures. *ACS Nano*, 5(1), 42-57.doi:10.1021/nn103098m
- Canadian Institutes of Health Research. (2007). Heart Disease - Your Health Research Dollars at Work 2006-2007. *Canadian Institutes of Health Research*. Repéré le 3 juillet 2011à <http://www.cihr-irsc.gc.ca/e/35178.html>
- Canadian Institutes of Health Research. (2009). Your Health Research Dollars at Work 2007-2008, Research About - Heart Disease. *Canadian Institutes of Health Research*. Repéré le 3 juillet 2011à <http://www.cihr-irsc.gc.ca/e/38547.html>
- Canadian Institutes of Health Research. (2011). Your Health Research Dollars at Work 2009-2010, Research About - Cardiovascular Health *Canadian Institutes of Health Research* Repéré le 7 juillet 2011à <http://www.cihr-irsc.gc.ca/e/43378.html>
- Carmiel-Haggai, M., Cederbaum, A. I., & Nieto, N. (2005). A high-fat diet leads to the progression of non-alcoholic fatty liver disease in obese rats. *The FASEB Journal*, 19(1), 136-138.doi:10.1096/fj.04-2291fje
- Charles River Laboratories. (2005). Biochemistry for US and Canadian C57BL/6NCrl Colonies for June-December 2005. *Charles River Laboratories*. Repéré le 14 juin 2011à http://www.criver.com/SiteCollectionDocuments/rm_rm_r_C57BL6_biochemistry_jun_dec_05.pdf
- Chiodini, B. D., Barlera, S., Franzosi, M. G., Beceiro, V. L., Inrona, M., & Tognoni, G. (2003). APO B gene polymorphisms and coronary artery disease: a meta-analysis. *Atherosclerosis*, 167(2), 355-366

- Cho, Y. W., Kim, J.-D., & Park, K. (2003). Polycation gene delivery systems: escape from endosomes to cytosol. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 55(6), 721-734.doi:10.1211/002235703765951311
- Chu, Y., Miller, J., & Heistad, D. (2007). Gene therapy for stroke: 2006 overview. *Current Hypertension Reports*, 9(1), 19-24
- Crooke, R. M., Graham, M. J., Lemonidis, K. M., Whipple, C. P., Koo, S., & Perera, R. J. (2005). An apolipoprotein B antisense oligonucleotide lowers LDL cholesterol in hyperlipidemic mice without causing hepatic steatosis. *J. Lipid Res.*, 46(5), 872-884.doi:10.1194/jlr.M400492-JLR200
- de Fougères, A., Vornlocher, H. P., Maraganore, J., & Lieberman, J. (2007). Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*, 6(6), 443-453.doi:10.1038/nrd2310
- Dehousse, V., Garbacki, N., Jaspard, S., Castagne, D., Piel, G., Colige, A., et al. (2010). Comparison of chitosan/siRNA and trimethylchitosan/siRNA complexes behaviour in vitro. *International Journal of Biological Macromolecules*, 46(3), 342-349.doi:10.1016/j.ijbiomac.2010.01.010
- Dergunov, A. D. (2011). Apolipoprotein E genotype as a most significant predictor of lipid response at lipid-lowering therapy: Mechanistic and clinical studies. *Biomedicine & Pharmacotherapy, In Press, Corrected Proof*.doi:10.1016/j.biopha.2011.04.003
- Dobrovolskaia, M. A., Aggarwal, P., Hall, J. B., & McNeil, S. E. (2008). Preclinical Studies To Understand Nanoparticle Interaction with the Immune System and Its Potential Effects on Nanoparticle Biodistribution. *Molecular Pharmaceutics*, 5(4), 487-495.doi:10.1021/mp800032f
- Dorsett, Y., & Tuschl, T. (2004). siRNAs: applications in functional genomics and potential as therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*, 3(4), 318-329
- Douglas, K. L., Piccirillo, C. A., & Tabrizian, M. (2008). Cell line-dependent internalization pathways and intracellular trafficking determine transfection efficiency of nanoparticle vectors. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 68(3), 676-687.doi:10.1016/j.ejpb.2007.09.002
- Duceppe, N., & Tabrizian, M. (2010). Advances in using chitosan-based nanoparticles for in vitro and in vivo drug and gene delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 7(10), 1191-1207.doi:doi:10.1517/17425247.2010.514604
- Dykxhoorn, D. M., & Lieberman, J. (2006). Knocking down Disease with siRNAs. *Cell*, 126(2), 231-235.doi:10.1016/j.cell.2006.07.007
- Dykxhoorn, D. M., Novina, C. D., & Sharp, P. A. (2003). Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4(6), 457-467
- Dykxhoorn, D. M., Palliser, D., & Lieberman, J. (2006). The silent treatment: siRNAs as small molecule drugs. *Gene Ther*, 13(6), 541-552

- Elbashir, S. M., Lendeckel, W., & Tuschl, T. (2001). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes & Development*, 15(2), 188-200
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669), 806-811
- Gao, S., Chen, J., Xu, X., Ding, Z., Yang, Y.-H., Hua, Z., et al. (2003). Galactosylated low molecular weight chitosan as DNA carrier for hepatocyte-targeting. *International Journal of Pharmaceutics*, 255(1-2), 57-68.doi:10.1016/s0378-5173(03)00082-6
- Ghosn, B., Singh, A., Li, M., Vlassov, A. V., Burnett, C., Puri, N., et al. (2010). Efficient Gene Silencing in Lungs and Liver Using Imidazole-Modified Chitosan As a Nanocarrier for Small Interfering RNA. *Oligonucleotides*, 20(3), 163-172.doi:10.1089/oli.2010.0235
- Gowda, S., Desai, P. B., Hull, V. V., Math, A. A. K., Vernekar, S. N., & Kulkarni, S. S. (2009). A review on laboratory liver function tests. *The Pan African Medical Journal* 3(17)
- Greenow, K., Pearce, N. J., & Ramji, D. P. (2005). The key role of apolipoprotein E in atherosclerosis. *Journal of Molecular Medicine*, 83(5), 329-342.doi:10.1007/s00109-004-0631-3
- Hansson, G. r. K. (2005). Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease. *New England Journal of Medicine*, 352(16), 1685-1695.doi:doi:10.1056/NEJMra043430
- Harris, E. H. (2005). Elevated Liver Function Tests in Type 2 Diabetes. *Clinical Diabetes*, 23(3), 115-119.doi:10.2337/diaclin.23.3.115
- Hatanaka, K., Asai, T., Koide, H., Kenjo, E., Tsuzuku, T., Harada, N., et al. (2010). Development of Double-Stranded siRNA Labeling Method Using Positron Emitter and Its In Vivo Trafficking Analyzed by Positron Emission Tomography. *Bioconjugate Chemistry*, 21(4), 756-763.doi:10.1021/bc9005267
- Hoemann, C. D., Sun, J., Légaré, A., McKee, M. D., & Buschmann, M. D. (2005). Tissue engineering of cartilage using an injectable and adhesive chitosan-based cell-delivery vehicle. *Osteoarthritis and Cartilage*, 13(4), 318-329.doi:10.1016/j.joca.2004.12.001
- Hoffler, U., Hobbie, K., Wilson, R., Bai, R., Rahman, A., Malarkey, D., et al. (2009). Diet-induced obesity is associated with hyperleptinemia, hyperinsulinemia, hepatic steatosis, and glomerulopathy in C57Bl/6J mice. *Endocrine*, 36(2), 311-325.doi:10.1007/s12020-009-9224-9
- Howard, K. A., & Kjems, J. (2007). Polycation-based nanoparticle delivery for improved RNA interference therapeutics. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 7(12), 1811-1822.doi:doi:10.1517/14712598.7.12.1811
- Howard, K. A., Paludan, S. R., Behlke, M. A., Besenbacher, F., Deleuran, B., & Kjems, J. (2008). Chitosan/siRNA Nanoparticle-mediated TNF-[alpha] Knockdown in Peritoneal Macrophages for Anti-inflammatory Treatment in a Murine Arthritis Model. *Mol Ther*, 17(1), 162-168

- Howard, K. A., Rahbek, U. L., Liu, X. D., Damgaard, C. K., Glud, S. Z., Andersen, M. O., et al. (2006). RNA interference in vitro and in vivo using a chitosan/siRNA nanoparticle system. *Molecular Therapy*, 14(4), 476-484.doi:10.1016/j.ymthe.2006.04.010
- Huang, M., Fong, C.-W., Khor, E., & Lim, L.-Y. (2005). Transfection efficiency of chitosan vectors: Effect of polymer molecular weight and degree of deacetylation. *Journal of Controlled Release*, 106(3), 391-406
- Huang, M., Khor, E., & Lim, L.-Y. (2004). Uptake and Cytotoxicity of Chitosan Molecules and Nanoparticles: Effects of Molecular Weight and Degree of Deacetylation. *Pharmaceutical Research*, 21(2), 344-353.doi:10.1023/B:PHAM.0000016249.52831.a5
- Iqbal, M., Lin, W., Jabbal-Gill, I., Davis, S. S., Steward, M. W., & Illum, L. (2003). Nasal delivery of chitosan–DNA plasmid expressing epitopes of respiratory syncytial virus (RSV) induces protective CTL responses in BALB/c mice. *Vaccine*, 21(13-14), 1478-1485.doi:10.1016/s0264-410x(02)00662-x
- Issa, M. M., Köping-Höggård, M., & Artursson, P. (2005). Chitosan and the mucosal delivery of biotechnology drugs. *Drug Discovery Today: Technologies*, 2(1), 1-6.doi:10.1016/j.ddtec.2005.05.008
- Jean, M., Alameh, M., Buschmann, M. D., & Merzouki, A. (2011a). Effective and safe gene-based delivery of GLP-1 using chitosan/plasmid-DNA therapeutic nanocomplexes in an animal model of type 2 diabetes. *Gene Ther*.doi:<http://www.nature.com/gt/journal/vaop/ncurrent/suppinfo/gt201125s1.html>
- Jean, M., Alameh, M., Buschmann, M. D., & Merzouki, A. (2011b). Effective and safe gene-based delivery of GLP-1 using chitosan/plasmid-DNA therapeutic nanocomplexes in an animal model of type 2 diabetes. *Gene Ther*, 18(8), 807-816.doi:<http://www.nature.com/gt/journal/v18/n8/suppinfo/gt201125s1.html>
- Jean, M., Alameh, M., De Jesus, D., Thibault, M., Lavertu, M., Darras, V., et al. (2011). Chitosan-based therapeutic nanoparticles for combination gene therapy and gene silencing of in vitro cell lines relevant to type 2 diabetes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*.doi:10.1016/j.ejps.2011.10.029
- Jean, M., Smaoui, F., Lavertu, M., Methot, S., Bouhdoud, L., Buschmann, M. D., et al. (2009). Chitosan-plasmid nanoparticle formulations for IM and SC delivery of recombinant FGF-2 and PDGF-BB or generation of antibodies. *Gene Ther*, 16(9), 1097-1110
- Jere, D., Jiang, H.-L., Kim, Y.-K., Arote, R., Choi, Y.-J., Yun, C.-H., et al. (2009). Chitosan-graft-polyethylenimine for Akt1 siRNA delivery to lung cancer cells. *International Journal of Pharmaceutics*, 378(1-2), 194-200.doi:10.1016/j.ijpharm.2009.05.046
- Jiang, H.-L., Kim, T.-H., Kim, Y.-K., Park, I.-Y., Cho, M.-H., & Cho, C.-S. (2008). Efficient gene delivery using chitosan–polyethylenimine hybrid systems. *Biomedical Materials*, 3(2), 025013
- Judge, A. D., Bola, G., Lee, A. C. H., & MacLachlan, I. (2006). Design of Noninflammatory Synthetic siRNA Mediating Potent Gene Silencing in Vivo. *Mol Ther*, 13(3), 494-505

- Juliano, R., Alam, M. R., Dixit, V., & Kang, H. (2008). Mechanisms and strategies for effective delivery of antisense and siRNA oligonucleotides. *Nucleic Acids Research*, 36(12), 4158-4171.doi:10.1093/nar/gkn342
- Juliano, R., Bauman, J., Kang, H., & Ming, X. (2009). Biological Barriers to Therapy with Antisense and siRNA Oligonucleotides. *Molecular Pharmaceutics*, 6(3), 686-695.doi:10.1021/mp900093r
- Kang, S., Wu, Y., & Li, X. (2004). Effects of statin therapy on the progression of carotid atherosclerosis: a systematic review and meta-analysis. *Atherosclerosis*, 177(2), 433-442.doi:10.1016/j.atherosclerosis.2004.08.005
- Katas, H., & Alpar, H. O. (2006). Development and characterisation of chitosan nanoparticles for siRNA delivery. *Journal of Controlled Release*, 115(2), 216-225
- Kean, T., & Thanou, M. (2010). Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62(1), 3-11.doi:10.1016/j.addr.2009.09.004
- Kiang, T., Wen, J., Lim, H. W., & Leong, K. W. K. W. (2004). The effect of the degree of chitosan deacetylation on the efficiency of gene transfection. *Biomaterials*, 25(22), 5293-5301.doi:10.1016/j.biomaterials.2003.12.036
- Kim, D. H., & Rossi, J. J. (2007). Strategies for silencing human disease using RNA interference. *Nat Rev Genet*, 8(3), 173-184
- Kim, S.-H., Goto, M., & Akaike, T. (2001). Specific Binding of Glucose-derivatized Polymers to the Asialoglycoprotein Receptor of Mouse Primary Hepatocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 276(38), 35312-35319.doi:10.1074/jbc.M009749200
- Koping-Hoggard, M., Varum, K. M., Issa, M., Danielsen, S., Christensen, B. E., Stokke, B. T., et al. (2004). Improved chitosan-mediated gene delivery based on easily dissociated chitosan polyplexes of highly defined chitosan oligomers. *Gene Ther*, 11(19), 1441-1452
- Lackner, K. J., Monge, J. C., Gregg, R. E., Hoeg, J. M., Triche, T. J., Law, S. W., et al. (1986). Analysis of the apolipoprotein B gene and messenger ribonucleic acid in abetalipoproteinemia. *The Journal of Clinical Investigation*, 78(6), 1707-1712
- Lai, W.-F., & Lin, M. C.-M. (2009). Nucleic acid delivery with chitosan and its derivatives. *Journal of Controlled Release*, 134(3), 158-168.doi:10.1016/j.jconrel.2008.11.021
- Lavertu, M., Méthot, S., Tran-Khanh, N., & Buschmann, M. D. (2006). High efficiency gene transfer using chitosan/DNA nanoparticles with specific combinations of molecular weight and degree of deacetylation. *Biomaterials*, 27(27), 4815-4824
- Lavertu, M., Xia, Z., Serreji, A. N., Berrada, M., Rodrigues, A., Wang, D., et al. (2003). A validated H-1 NMR method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 32(6), 1149-1158.doi:10.1016/s0731-7085(03)00115-9
- Lee, M.-K., Chun, S.-K., Choi, W.-J., Kim, J.-K., Choi, S.-H., Kim, A., et al. (2005). The use of chitosan as a condensing agent to enhance emulsion-mediated gene transfer. *Biomaterials*, 26(14), 2147-2156.doi:10.1016/j.biomaterials.2004.07.008

- Lee, M.-Y., Park, S.-J., Park, K., Kim, K. S., Lee, H., & Hahn, S. K. (2011). Target-Specific Gene Silencing of Layer-by-Layer Assembled Gold–Cysteamine/siRNA/PEI/HA Nanocomplex. *ACS Nano*, 5(8), 6138-6147.doi:10.1021/nn2017793
- Lee, M., Nah, J.-W., Kwon, Y., Koh, J. J., Ko, K. S., & Kim, S. W. (2001). Water-Soluble and Low Molecular Weight Chitosan-Based Plasmid DNA Delivery. *Pharmaceutical Research*, 18(4), 427-431.doi:10.1023/a:1011037807261
- Lee, S.-K., & Kumar, P. (2009). Conditional RNAi: Towards a silent gene therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61(7-8), 650-664.doi:10.1016/j.addr.2009.03.016
- Lee, S. H., Mok, H., Jo, S., Hong, C. A., & Park, T. G. (2011). Dual gene targeted multimeric siRNA for combinatorial gene silencing. *Biomaterials*, 32(9), 2359-2368.doi:10.1016/j.biomaterials.2010.11.062
- Leung, R. K. M., & Whittaker, P. A. (2005). RNA interference: From gene silencing to gene-specific therapeutics. *Pharmacology & Therapeutics*, 107(2), 222-239
- Lewis, D. L., & Wolff, J. A. (2007). Systemic siRNA delivery via hydrodynamic intravascular injection. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59(2-3), 115-123.doi:10.1016/j.addr.2007.03.002
- Li, X. W., Lee, D. K. L., Chan, A. S. C., & Alpar, H. O. (2003). Sustained expression in mammalian cells with DNA complexed with chitosan nanoparticles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1630(1), 7-18.doi:10.1016/j.bbaexp.2003.08.011
- Liao, W., & Ning, G. (2006). Knockdown of apolipoprotein B, an atherogenic apolipoprotein, in HepG2 cells by lentivirus-mediated siRNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 344(2), 478-483
- Libby, P. (2002). Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, 420(6917), 868-874
- Libby, P., Okamoto, Y., Rocha, V. Z., & Folco, E. (2010). Inflammation in Atherosclerosis Transition From Theory to Practice. *Circulation Journal*, 74(2), 213-220
- Libby, P., Ridker, P. M., & Maseri, A. (2002). Inflammation and Atherosclerosis. *Circulation*, 105(9), 1135-1143.doi:10.1161/hc0902.104353
- Liu, X., Howard, K. A., Dong, M., Andersen, M. Ø., Rahbek, U. L., Johnsen, M. G., et al. (2007). The influence of polymeric properties on chitosan/siRNA nanoparticle formulation and gene silencing. *Biomaterials*, 28(6), 1280-1288
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001a). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $[\Delta\Delta]CT$ Method. *Methods*, 25(4), 402-408.doi:10.1006/meth.2001.1262
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001b). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ Method. *Methods*, 25(4), 402-408.doi:10.1006/meth.2001.1262

- Lloyd-Jones, D., Adams, R. J., Brown, T. M., Carnethon, M., Dai, S., De Simone, G., et al. (2010). Heart Disease and Stroke Statistics--2010 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*, 121(7), e46-215.doi:10.1161/circulationaha.109.192667
- Lusis, A. J. (2000). Atherosclerosis. *Nature*, 407(6801), 233-241
- Ma, P. L., Lavertu, M., Winnik, F. o. M., & Buschmann, M. D. (2009). New Insights into Chitosan–DNA Interactions Using Isothermal Titration Microcalorimetry. *Biomacromolecules*, 10(6), 1490-1499.doi:10.1021/bm900097s
- MacLaughlin, F. C., Mumper, R. J., Wang, J., Tagliaferri, J. M., Gill, I., Hinchcliffe, M., et al. (1998). Chitosan and depolymerized chitosan oligomers as condensing carriers for in vivo plasmid delivery. *Journal of Controlled Release*, 56(1-3), 259-272.doi:10.1016/s0168-3659(98)00097-2
- Mahley, R. W., Innerarity, T. L., Rall, S. C., Jr., & Weisgraber, K. H. (1984). Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J. Lipid Res.*, 25(12), 1277-1294
- Mao, S., Sun, W., & Kissel, T. (2010). Chitosan-based formulations for delivery of DNA and siRNA. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62(1), 12-27.doi:10.1016/j.addr.2009.08.004
- Marcovina, S., & Packard, C. J. (2006). Measurement and meaning of apolipoprotein AI and apolipoprotein B plasma levels. *Journal of Internal Medicine*, 259(5), 437-446.doi:10.1111/j.1365-2796.2006.01648.x
- McCarroll, J., Baigude, H., Yang, C.-S., & Rana, T. M. (2009). Nanotubes Functionalized with Lipids and Natural Amino Acid Dendrimers: A New Strategy to Create Nanomaterials for Delivering Systemic RNAi. *Bioconjugate Chemistry*, 21(1), 56-63.doi:10.1021/bc900296z
- Medina-Kauwe, L. K., Xie, J., & Hamm-Alvarez, S. (2005). Intracellular trafficking of nonviral vectors. *Gene Ther*, 12(24), 1734-1751
- Meister, G., & Tuschl, T. (2004). Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*, 431(7006), 343-349
- Motta, M., Bennati, E., Cardillo, E., Ferlito, L., Passamonte, M., & Malaguarnera, M. (2008). The significance of apolipoprotein-B (Apo-B) in the elderly as a predictive factor of cardio-cerebrovascular complications. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 49(1), 162-164
- NEUROtiker. (2008). Schematic drawing of the enzymatic synthesis of Chitosan. Repéré le 7 octobre 2011 à http://fr.wikipedia.org/wiki/Fichier:Chitosan_Synthese.svg
- Nichols, G. A., Koro, C. E., Chan, W., Bowlin, S. J., & Sprecher, D. L. (2006). The association between fibrate use, change in high-density lipoprotein cholesterol, and the risk of cardiovascular disease: A retrospective chart review involving up to 8 years of follow-up. *Clinical Therapeutics*, 28(2), 243-250.doi:10.1016/j.clinthera.2006.02.003
- Nimesh, S., Thibault, M., Lavertu, M., & Buschmann, M. (2010). Enhanced Gene Delivery Mediated by Low Molecular Weight Chitosan/DNA Complexes: Effect of pH and Serum. *Molecular Biotechnology*, 46(2), 182-196.doi:10.1007/s12033-010-9286-1

- Nishina, K., Unno, T., Uno, Y., Kubodera, T., Kanouchi, T., Mizusawa, H., et al. (2008). Efficient In Vivo Delivery of siRNA to the Liver by Conjugation of [alpha]-Tocopherol. *Mol Ther*, 16(4), 734-740
- Noh, S. M., Park, M. O., Shim, G., Han, S. E., Lee, H. Y., Huh, J. H., et al. (2010). Pegylated poly-L-arginine derivatives of chitosan for effective delivery of siRNA. *Journal of Controlled Release*, 145(2), 159-164.doi:10.1016/j.jconrel.2010.04.005
- Novina, C. D., & Sharp, P. A. (2004). The RNAi revolution. *Nature*, 430(6996), 161-164
- O'Donnell, C. J., & Elosua, R. (2008). Cardiovascular Risk Factors. Insights From Framingham Heart Study. *Revista Española de Cardiología (English Edition)*, 61(3), 299-310
- Ohsfeldt, R. L., Gandhi, S. K., Fox, K. M., Bullano, M. F., & Davidson, M. (2010). Medical and cost burden of atherosclerosis among patients treated in routine clinical practice. *Journal of Medical Economics*, 0(0), 500-507.doi:doi:10.3111/13696998.2010.506348
- Olofsson, S. O., & Boren, J. (2005). Apolipoprotein B: a clinically important apolipoprotein which assembles atherogenic lipoproteins and promotes the development of atherosclerosis. *Journal of Internal Medicine*, 258(5), 395-410.doi:10.1111/j.1365-2796.2005.01556.x
- Onsosyen, E., & Skaugrud, O. (1990). Metal recovery using chitosan. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 49(4), 395-404.doi:10.1002/jctb.280490410
- Paoletti, R., Gotto, A. M., Jr., & Hajjar, D. P. (2004). Inflammation in Atherosclerosis and Implications for Therapy. *Circulation*, 109(23_suppl_1), III-20-26.doi:10.1161/01.CIR.0000131514.71167.2e
- Park, K., Hong, S. W., Hur, W., Lee, M.-Y., Yang, J.-A., Kim, S. W., et al. (2011). Target specific systemic delivery of TGF-[beta] siRNA/(PEI-SS)-g-HA complex for the treatment of liver cirrhosis. *Biomaterials*, 32(21), 4951-4958.doi:10.1016/j.biomaterials.2011.03.044
- Popielarski, S. R., Hu-Lieskovan, S., French, S. W., Triche, T. J., & Davis, M. E. (2005). A Nanoparticle-Based Model Delivery System To Guide the Rational Design of Gene Delivery to the Liver. 2. In Vitro and In Vivo Uptake Results. *Bioconjugate Chemistry*, 16(5), 1071-1080.doi:10.1021/bc0501146
- Raemdonck, K., Vandenbroucke, R. E., Demeester, J., Sanders, N. N., & De Smedt, S. C. (2008). Maintaining the silence: reflections on long-term RNAi. *Drug Discovery Today*, 13(21-22), 917-931.doi:10.1016/j.drudis.2008.06.008
- Roberts, R. A., Ganey, P. E., Ju, C., Kamendulis, L. M., Rusyn, I., & Klaunig, J. E. (2007). Role of the Kupffer Cell in Mediating Hepatic Toxicity and Carcinogenesis. *Toxicological Sciences*, 96(1), 2-15.doi:10.1093/toxsci/kfl173
- Rojanarata, T., Opanasopit, P., Techaarpornkul, S., Ngawhirunpat, T., & Ruktanonchai, U. (2008). Chitosan-Thiamine Pyrophosphate as a Novel Carrier for siRNA Delivery. *Pharmaceutical Research*, 25(12), 2807-2814.doi:10.1007/s11095-008-9648-6

- Rozema, D. B., Lewis, D. L., Wakefield, D. H., Wong, S. C., Klein, J. J., Roesch, P. L., et al. (2007). Dynamic PolyConjugates for targeted in vivo delivery of siRNA to hepatocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(32), 12982-12987. doi:10.1073/pnas.0703778104
- Rudzinski, W. E., & Aminabhavi, T. M. (2010). Chitosan as a carrier for targeted delivery of small interfering RNA. *International Journal of Pharmaceutics*, 399(1-2), 1-11. doi:10.1016/j.ijpharm.2010.08.022
- Saranya, N., Moorthi, A., Saravanan, S., Devi, M. P., & Selvamurugan, N. (2011). Chitosan and its derivatives for gene delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*, 48(2), 234-238. doi:10.1016/j.ijbiomac.2010.11.013
- Scarborough, P., Peto, V., Bhatnagar, P., Kaur, A., Leal, J., Luengo-Fernandez, R., et al. (2009). Stroke Statistics 2009 (D. o. P. Health, Trans.). Oxford: University of Oxford.
- Shiri, W., & Dan, P. (2010). RNAi nanomedicines: challenges and opportunities within the immune system. *Nanotechnology*, 21(23), 232001
- Skrypina, N. A., Timofeeva, A. V., Khaspekoy, G. L., Savochkina, L. P., & Beabealashvili, R. S. (2003). Total RNA suitable for molecular biology analysis. *Journal of Biotechnology*, 105(1-2), 1-9
- Snoeys, J., Lievens, J., Wisse, E., Jacobs, F., Duimel, H., Collen, D., et al. (2007). Species differences in transgene DNA uptake in hepatocytes after adenoviral transfer correlate with the size of endothelial fenestrae. *Gene Ther*, 14(7), 604-612
- Sonawane, N. D., Szoka, F. C., & Verkman, A. S. (2003). Chloride Accumulation and Swelling in Endosomes Enhances DNA Transfer by Polyamine-DNA Polyplexes. *Journal of Biological Chemistry*, 278(45), 44826-44831. doi:10.1074/jbc.M308643200
- Soo Choi, H., Liu, W., Misra, P., Tanaka, E., Zimmer, J. P., Itty Ipe, B., et al. (2007). Renal clearance of quantum dots. *Nat Biotech*, 25(10), 1165-1170. doi:http://www.nature.com/nbt/journal/v25/n10/supinfo/nbt1340_S1.html
- Soutschek, J., Akinc, A., Bramlage, B., Charisse, K., Constien, R., Donoghue, M., et al. (2004). Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature*, 432(7014), 173-178
- Spagnoli, L. G., Bonanno, E., Sangiorgi, G., & Mauriello, A. (2007). Role of Inflammation in Atherosclerosis. *J Nucl Med*, 48(11), 1800-1815. doi:10.2967/jnumed.107.038661
- Stein, O., & Stein, Y. (1999). Atheroprotective mechanisms of HDL. *Atherosclerosis*, 144(2), 285-301. doi:10.1016/s0021-9150(99)00065-9
- Strand, S. P., Lelu, S., Reitan, N. K., de Lange Davies, C., Artursson, P., & Vårum, K. M. (2010). Molecular design of chitosan gene delivery systems with an optimized balance between polyplex stability and polyplex unpacking. *Biomaterials*, 31(5), 975-987. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.09.102
- Tadin-Strapps, M., Peterson, L. B., Cumiskey, A.-M., Rosa, R. L., Mendoza, V. H., Castro-Perez, J., et al. (2011). siRNA-induced liver ApoB knockdown lowers serum LDL-cholesterol in

- a mouse model with human-like serum lipids. *Journal of Lipid Research*, 52(6), 1084-1097.doi:10.1194/jlr.M012872
- Tahara, K., Sakai, T., Yamamoto, H., Takeuchi, H., & Kawashima, Y. (2008). Establishing chitosan coated PLGA nanosphere platform loaded with wide variety of nucleic acid by complexation with cationic compound for gene delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 354(1-2), 210-216.doi:10.1016/j.ijpharm.2007.11.002
- Takahashi, Y., Nishikawa, M., & Takakura, Y. (2009). Nonviral vector-mediated RNA interference: Its gene silencing characteristics and important factors to achieve RNAi-based gene therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61(9), 760-766.doi:10.1016/j.addr.2009.04.006
- Tan, W., Krishnaraj, R., & Desai, T. A. (2000, 2000). *Influence of chitosan on cell viability and proliferation in three dimensional collagen gels*. Communication présentée Engineering in Medicine and Biology Society, 2000. Proceedings of the 22nd Annual International Conference of the IEEE.
- Techarpornkul, S., Wongkupasert, S., Opanasopit, P., Apirakaramwong, A., Nunthanid, J., & Ruktanonchai, U. (2010). Chitosan-Mediated siRNA Delivery & In Vitro Effect of Polymer Molecular Weight, Concentration and Salt Forms. *AAPS PharmSciTech*, 11(1), 64-72.doi:10.1208/s12249-009-9355-6
- Thibault, M., Astolfi, M., Tran-Khanh, N., Lavertu, M., Darras, V., Merzouki, A., et al. (2011). Excess polycation mediates efficient chitosan-based gene transfer by promoting lysosomal release of the polyplexes. *Biomaterials*, 32(20), 4639-4646.doi:10.1016/j.biomaterials.2011.03.010
- Thibault, M., Nimesh, S., Lavertu, M., & Buschmann, M. D. (2010). Intracellular Trafficking and Decondensation Kinetics of Chitosan-pDNA Polyplexes. *Mol Ther*, 18(10), 1787-1795.doi:<http://www.nature.com/mt/journal/v18/n10/supinfo/mt2010143s1.html>
- Thomas, E. I., Mu, L., Hua, Q., Igor, A. P., Katarzyna, R., Xiufen, Z., et al. (2004). RNA Interference: A Potent Tool for Gene-Specific Therapeutics. *American Journal of Transplantation*, 4(8), 1227-1236
- Thompson, G. R., Naoumova, R. P., & Watts, G. F. (1996). Role of cholesterol in regulating apolipoprotein B secretion by the liver. *Journal of Lipid Research*, 37(3), 439-447
- Toth, P. P. (2008). Subclinical atherosclerosis: what it is, what it means and what we can do about it. *International Journal of Clinical Practice*, 62(8), 1246-1254.doi:10.1111/j.1742-1241.2008.01804.x
- Twisk, J., Gillian-Daniel, D. L., Tebon, A., Wang, L., Barrett, P. H. R., & Attie, A. D. (2000). The role of the LDL receptor in apolipoprotein B secretion. *The Journal of Clinical Investigation*, 105(4), 521-532
- Varkouhi, A. K., Lammers, T., Schiffelers, R. M., van Steenberg, M. J., Hennink, W. E., & Storm, G. (2011). Gene silencing activity of siRNA polyplexes based on biodegradable polymers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 77(3), 450-457.doi:10.1016/j.ejpb.2010.11.016

- Vaverkova, H., Karasek, D., Novotny, D., Jackuliakova, D., Lukes, J., Halenka, M., et al. (2009). Apolipoprotein B versus LDL-cholesterol: Association with other risk factors for atherosclerosis. *Clinical Biochemistry*, 42(12), 1246-1251
- Véniant, M. M., Pierotti, V., Newland, D., Cham, C. M., Sanan, D. A., Walzem, R. L., et al. (1997). Susceptibility to atherosclerosis in mice expressing exclusively apolipoprotein B48 or apolipoprotein B100. *The Journal of Clinical Investigation*, 100(1), 180-188
- Vercauteren, D., Vandenbroucke, R. E., Jones, A. T., Rejman, J., Demeester, J., De Smedt, S. C., et al. (2010). The Use of Inhibitors to Study Endocytic Pathways of Gene Carriers: Optimization and Pitfalls. *Mol Ther*, 18(3), 561-569. doi:<http://www.nature.com/mt/journal/v18/n3/supinfo/mt2009281s1.html>
- Vical. (2011). A Phase 3 Pivotal Trial Comparing Allovectin-7® Alone vs Chemotherapy Alone in Patients With Stage 3 or Stage 4 Melanoma. Repéré le 9 septembre 2011 à <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00395070?term=Allovectin-7&rank=1>
- Walldius, G., & Jungner, I. (2006). The apoB/apoA-I ratio: a strong, new risk factor for cardiovascular disease and a target for lipid-lowering therapy - a review of the evidence. *Journal of Internal Medicine*, 259(5), 493-519. doi:10.1111/j.1365-2796.2006.01643.x
- Wang, J., Zeng, Z., Xiao, R., Xie, T., Zhou, G., Zhan, X., et al. (2011). Recent advances of chitosan nanoparticles as drug carriers *International Journal of Nanomedicine* 6(1), 765-774. doi:10.2147/IJNS17296
- Watanabe, K., Harada-Shiba, M., Suzuki, A., Gokuden, R., Kurihara, R., Sugao, Y., et al. (2009). In vivo siRNA delivery with dendritic poly(l-lysine) for the treatment of hypercholesterolemia. *Molecular BioSystems*, 5(11), 1306-1310
- Weecharangan, W., Opanasopit, P., Ngawhirunpat, T., Apirakaramwong, A., Rojanarata, T., Ruktanonchai, U., et al. (2008). Evaluation of chitosan salts as non-viral gene vectors in CHO-K1 cells. *International Journal of Pharmaceutics*, 348(1-2), 161-168. doi:10.1016/j.ijpharm.2007.07.011
- Wolfrum, C., Shi, S., Jayaprakash, K. N., Jayaraman, M., Wang, G., Pandey, R. K., et al. (2007). Mechanisms and optimization of in vivo delivery of lipophilic siRNAs. *Nat Biotech*, 25(10), 1149-1157. doi:http://www.nature.com/nbt/journal/v25/n10/supinfo/nbt1339_S1.html
- Xu, L., & Anchordoquy, T. (2011). Drug delivery trends in clinical trials and translational medicine: Challenges and opportunities in the delivery of nucleic acid-based therapeutics. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100(1), 38-52. doi:10.1002/jps.22243
- Yang, C. Y., Gu, Z. W., Weng, S. A., Kim, T. W., Chen, S. H., Pownall, H. J., et al. (1989). STRUCTURE OF APOLIPOPROTEIN B-100 OF HUMAN LOW-DENSITY LIPOPROTEINS. *Arteriosclerosis*, 9(1), 96-108
- Yang, S., & May, S. (2008). Release of cationic polymer-DNA complexes from the endosome: A theoretical investigation of the proton sponge hypothesis. *The Journal of Chemical Physics*, 129(18), 185105-185109. doi:10.1063/1.3009263

- Zamel, R., Khan, R., Pollex, R., & Hegele, R. (2008). Abetalipoproteinemia: two case reports and literature review. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 3(1), 19
- Zhang, H., & Neau, S. H. (2001). In vitro degradation of chitosan by a commercial enzyme preparation: effect of molecular weight and degree of deacetylation. *Biomaterials*, 22(12), 1653-1658.doi:10.1016/s0142-9612(00)00326-4
- Zhang, X., Zhang, H., Wu, Z., Wang, Z., Niu, H., & Li, C. (2008). Nasal absorption enhancement of insulin using PEG-grafted chitosan nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 68(3), 526-534.doi:10.1016/j.ejpb.2007.08.009
- Zimmermann, T. S., Lee, A. C. H., Akinc, A., Bramlage, B., Bumcrot, D., Fedoruk, M. N., et al. (2006). RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature*, 441(1), 111-114

ANNEXE - Communications

Tous les résultats présentés dans le cadre de ce mémoire ont été ou sont sur le point d'être publiés.

Communications orales

De Jesus D. L., Alameh M.-G., Jean M., Buschmann M. D., Merzouki A.. (Mai 2010)
Caractérisation des nanocomplexes chitosane/ODN-ApoB par les techniques d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide, DLS et ESEM. 78^e congrès de l'association de francophone pour le savoir (ACFAS), Montréal, Québec, Canada.

De Jesus D. L., Alameh M.-G., Jean M., Buschmann M. D., Merzouki A.. (Mai 2011)
Therapeutic Lowering of Circulating ApoB in Atherosclerotic Mice by Intravenous Administration of Chitosan-siRNA Nanoparticles. Canadian Chapter of the Controlled Release Society Symposium (CC-CRS), Montréal, Québec, Canada.

Publications

Alameh, M., Jean, M., DeJesus, D., Buschmann, M. D., & Merzouki, A. (2010). Chitosanase-based method for RNA isolation from cells transfected with chitosan/siRNA nanocomplexes for real-time RT-PCR in gene silencing. *IJN*, 5, 473-481

Jean, M., Alameh, M., De Jesus, D., Thibault, M., Lavertu, M., Darras, V., et al. (2011). Chitosan-based therapeutic nanoparticles for combination gene therapy and gene silencing of in vitro cell lines relevant to type 2 diabetes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*.doi:10.1016/j.ejps.2011.10.029

Alameh, M.*, DeJesus, D.*, Jean, M., Darras V., Thibault M., Lavertu M., Buschmann M.D., Merzouki A. Chitosan-Nanoparticulate system for therapeutic siRNA delivery. (*International Journal of Nanomedicine* (IJN), accepté)

* Ces auteurs ont contribué également